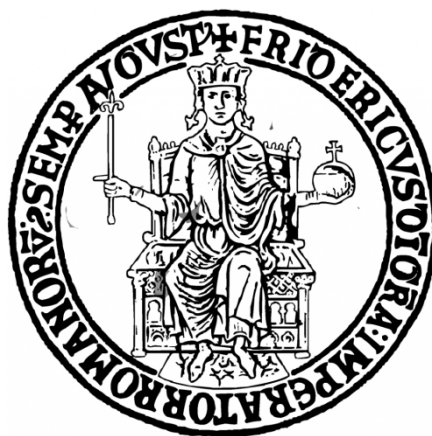


Università di Napoli Federico II



Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata

XXV Ciclo

**Caratterizzazione di batteri pigmentati e
studio degli effetti di molecole batteriche e
vegetali su cellule umane**

Tutor: Prof. Ezio Ricca

Dottorando: Nicola Manzo

Coordinatore: Prof. Ezio Ricca

| | |
|---|----------------|
| PREFAZIONE | pag. 1 |
| Capitolo 1 - Carbohydrate-active enzymes da Bacilli pigmentati: un approccio genomico per valutare l'utilizzo dei carboidrati | pag. 4 |
| 1.1 Introduzione | pag. 5 |
| 1.2 Materiali e Metodi | pag. 11 |
| 1.2.1 Condizioni di crescita dei batteri | pag. 11 |
| 1.2.2 Annotazione dei CAZymes | pag. 11 |
| 1.2.3 Produzione di biofilm | pag. 13 |
| 1.2.4 Saggi di adesione e degradazione della mucina | pag. 14 |
| 1.3 Risultati | pag. 17 |
| 1.3.1 I genomi di <i>B.indicus</i> HU36 and <i>B.firmus</i> GB1 contengono un numero elevato di CAZymes | pag. 17 |
| 1.3.2 Correlazione tra il potenziale idrolitico dei genomi di <i>B.firmus</i> e <i>B.indicus</i> e la crescita su carboidrati selezionati | pag. 20 |
| 1.3.3 Correlazione tra il potenziale idrolitico dei genomi di <i>B.firmus</i> e <i>B.indicus</i> e la produzione di biofilm. | pag. 26 |
| 1.3.4 Correlazione tra il potenziale idrolitico dei genomi di <i>B.firmus</i> e <i>B.indicus</i> e la capacità di legare e degradare la mucina. | pag. 29 |
| 1.4 Conclusioni | pag. 33 |
| 1.5 Bibliografia | pag. 35 |
| ALLEGATO 1 | pag. 41 |

| | |
|--|---------|
| Capitolo 2 - Pigmentazione e sporulazione sono destini cellulari alternativi in <i>Bacillus pumilus</i> SF214. | pag. 42 |
| 2.1 Introduzione | pag. 43 |
| 2.2 Materiali e Metodi | pag. 48 |
| 2.2.1 <i>Condizioni di crescita dei batteri, induzione e purificazione delle spore</i> | pag. 48 |
| 2.2.2 <i>Estrazione e rivelazione del pigmento</i> | pag. 49 |
| 2.2.3 <i>Test dell' H_2O_2</i> | pag. 49 |
| 2.2.4 <i>Microscopia a fluorescenza e immunofluorescenza</i> | pag. 50 |
| 2.3 Risultati | pag. 52 |
| 2.3.1 <i>La produzione di pigmento è dipendente dalla fase di crescita, dalla temperatura e dalla disponibilità di nutrienti</i> | pag. 52 |
| 2.3.2 <i>Produzione eterogenea del pigmento</i> | pag. 54 |
| 2.3.3 <i>La produzione del pigmento avviene solo in cellule non sporulanti</i> | pag. 58 |
| 2.3.4 <i>La produzione della matrice avviene in una sottopopolazione di cellule pigmentate.</i> | pag. 62 |
| 2.3.5 <i>Il pigmento di SF214 conferisce resistenza all'H_2O_2</i> | pag. 66 |
| 2.4 Discussione | pag. 70 |
| 2.5 Bibliografia | pag. 73 |
| ALLEGATO 2 | pag. 77 |

| | |
|--|-----------------|
| Capitolo 3 - Il batterio probiotico <i>Lactobacillus gasseri</i> SF1183 influenza la crescita e la sopravvivenza delle cellule epiteliali intestinale | pag. 78 |
| 3.1 Introduzione | pag. 79 |
| 3.2 Materiali e Metodi | pag. 82 |
| 3.2.1 <i>Crescita dei batteri e preparazione dei mezzi di coltura.</i> | pag. 82 |
| 3.2.2 <i>Colture cellulari e trattamento con CM batterico.</i> | pag. 83 |
| 3.2.3 <i>Analisi di SDS-PAGE e Western-Blot</i> | pag. 84 |
| 3.2.4 <i>Crescita cellulare e analisi di citometria di flusso</i> | pag. 85 |
| 3.2.5 <i>Saggio MTS</i> | pag. 86 |
| 3.3 Risultati e discussione | pag. 86 |
| 3.3.1 <i>Il mezzo condizionato (CM) di <i>L.gasseri</i> SF1183 protegge le cellule HCT116 dall'apoptosi indotta dal TNF-α</i> | pag. 86 |
| 3.3.2 <i>Il CM di <i>L.gasseri</i> SF1183 contiene molecola/e solubile bioattiva, secreta durante la fase stazionaria</i> | pag. 89 |
| 3.3.3 <i>Il CM di <i>L. gasseri</i> SF1183 influenza la proliferazione cellulare delle cellule HCT116</i> | pag. 91 |
| 3.3.4 <i>Il CM di <i>L. gasseri</i> SF1183 protegge le cellule HCT116 dall'apoptosi indotta dal cisplatino</i> | pag. 95 |
| 3.4 Conclusioni | pag. 97 |
| 3.5 Bibliografia | pag. 100 |
| ALLEGATO 3 | pag. 106 |

| | |
|--|----------|
| Capitolo 4 - Approccio biochimico e cellulare per lo studio dell'attività antiproliferativa e pro-differenziativa degli estratti di foglie di <i>Aloe Arborescens</i> | pag.107 |
| 4.1 Introduzione | pag. 108 |
| 4.2 Materiali e Metodi | pag. 109 |
| 4.2.1 <i>Preparazione dell' estratto grezzo di foglie.</i> | pag. 109 |
| 4.2.2 <i>Trattamento delle colture cellulari con Aloe Arborescens.</i> | pag. 110 |
| 4.2.3 <i>Analisi della crescita cellulare</i> | pag. 111 |
| 4.2.4 <i>Analisi di citometria di flusso</i> | Pag. 111 |
| 4.2.5 <i>Differenziamento dei cheratinociti</i> | pag. 112 |
| 4.2.6 <i>SDS-PAGE e immuno-blot</i> | pag. 113 |
| 4.2.7 <i>Colorazione delle cellule per la fluorescenza</i> | pag. 114 |
| 4.2.8 <i>Analisi dei metaboliti</i> | pag. 115 |
| 4.2.9 <i>Analisi GC-MS</i> | Pag. 115 |
| 4.2.10 <i>Elettroforesi bidimensionale (2DE)</i> | pag. 116 |
| 4.2.11 <i>Analisi delle immagini</i> | pag. 117 |
| 4.2.12 <i>Digestione in situ</i> | pag. 117 |
| 4.2.13 <i>Analisi mediante nanoHPLC-chip MS/MS</i> | pag. 118 |
| 4.2.14 <i>Identificazione delle proteine</i> | pag. 119 |
| 4.2.15 <i>Microscopia a contrasto di fase</i> | pag. 120 |
| 4.2.16 <i>Ceppi batterici e condizioni di crescita</i> | pag. 120 |
| 4.2.17 <i>Test antibatterici</i> | pag. 121 |
| 4.3 Risultati e discussioni | pag. 121 |
| 4.3.1 <i>Analisi GC-MS</i> | pag. 121 |
| 4.3.2 <i>L'aloe arborescens colpisce la proliferazione delle cellule cancerose.</i> | pag. 123 |

| | | |
|------------|---|----------|
| 4.3.3 | <i>L'aloe arborescens induce la differenziazione nei cheratinociti.</i> | pag. 128 |
| 4.3.4 | <i>Test antibatterici.</i> | pag. 134 |
| 4.3.5 | <i>Analisi proteomica.</i> | pag. 135 |
| 4.4 | Conclusioni | pag. 139 |
| 4.5 | Bibliografia | pag. 140 |
| | ALLEGATO 4 | Pag. 142 |

Prefazione

Il lavoro svolto durante questi tre anni di Dottorato è raccolto in questa Tesi ed è suddiviso in quattro capitoli distinti. Due capitoli sono dedicati alla caratterizzazione di bacilli produttori di carotenoidi, uno all'interazione tra il batterio lattico *Lactobacillus gasseri* e cellule dell'epitelio intestinale umano ed uno agli effetti di un estratto della pianta *Aloe arborescens* su diverse linee cellulari umane. Tali argomenti, anche se apparentemente indipendenti, sono invece strettamente correlati e sono riconducibili al tema comune dell'interazione tra cellule intestinali umane e batteri e/o molecole da essi prodotte.

I carotenoidi sono molecole con elevata attività anti-ossidante e sono, per questo motivo, ampiamente utilizzati dall'industria farmaceutica ed alimentare come integratori per uso umano. Recenti studi hanno evidenziato che i carotenoidi di origine batterica sono più resistenti e stabili se esposti ai succhi gastrici ed hanno capacità anti-ossidanti migliori rispetto ai carotenoidi di origine vegetale. Per tale motivo la ricerca di batteri produttori di carotenoidi, la caratterizzazione di tali organismi e dei pigmenti da essi prodotti ha avuto negli ultimi anni un grande impulso. In questo contesto mi sono occupato della caratterizzazione genomica di due bacilli, *Bacillus firmus* GB1 e *B. indicus* HU36, produttori rispettivamente di un carotenoide rosso ed uno giallo-arancio. Nell'ambito di un progetto finanziato dall'Unione

Europea il genoma di questi due batteri è stato interamente sequenziato ed io mi sono occupato dell'annotazione dei geni codificanti per i CAZymes (Carbohydrate Active enZymes) nei due organismi. Tale parte di lavoro, che in parte è stata svolta da me presso l'Istituto "Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques" del CNRS di Marsiglia (Francia) sotto la supervisione del dr. Bernard Henrissat, è descritta nel capitolo 1 ed è stata pubblicata nel 2011 (**Manzo N.**, D'Apuzzo E, Coutinho PM, Cutting SM, Henrissat B, Ricca E. 2011. Carbohydrate-active enzymes from pigmented Bacilli: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation" BMC Microbiol. 11:198).

Rimanendo nello stesso contesto mi sono poi occupato della caratterizzazione di un altro bacillo pigmentato, *Bacillus pumilus* SF214, che produce un carotenoide idrosolubile color arancio. Questa parte di lavoro è descritta nel capitolo 2 ed è stata recentemente accettata per la pubblicazione (**Manzo N.**, Di Luccia B., Isticato R., D'Apuzzo E., De Felice M, Ricca E. 2013. Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *Bacillus pumilus* SF214. PLOS ONE *in press*).

Nel capitolo 3 è, invece, raccolto il lavoro da me svolto sull'interazione tra il batterio lattico *Lactobacillus gasseri* SF1183 e cellule dell'epitelio intestinale umano HCT116. I batteri lattici sono organismi comunemente isolati da campioni intestinali, la cui somministrazione per via orale è considerata benefica per la salute umana. Per tale motivo, alcune specie di

batteri lattici sono ampiamente utilizzate commercialmente come probiotici. Nonostante il vasto impiego commerciale non è del tutto chiaro il tipo di interazione che avviene tra questi batteri e le cellule intestinali. In tale contesto mi sono occupato dell'effetto che molecole secrete da *L. gasseri* SF1183 hanno sul ciclo cellulare di cellule modello dell'epitelio intestinale umano. Tale parte di lavoro è descritta nel capitolo 3 ed è stata recentemente sottomessa per la pubblicazione.

Infine, grazie alla collaborazione con il Laboratorio di Genetica della professoressa Viola Calabrò, mi sono occupato anche di uno studio su estratti di *Aloe Arborescens*, dimostrando che essi hanno effetti anti-proliferativi e pro-differenziativi su diverse linee cellulari umane, oltre a indurre la produzione da parte dei cheratinociti di molecole antimicrobiche. Tale parte di lavoro è descritta nel capitolo 4 ed è stata pubblicata nel 2013 (Di Luccia B, **Manzo N**, Vivo M, Galano E, Amoresano A, Crescenzi E, Pollice A, Tudisco R, Infascelli F, Calabrò V. 2013. A biochemical and cellular approach to explore the antiproliferative and prodifferentiative activity of *Aloe Arborescens* leaf extract. *Phytother Res.* doi: 10.1002/ptr.4939).

CAPITOLO 1

Carbohydrate-active enzymes da Bacilli pigmentati: un
approccio genomico per valutare l'utilizzo dei
carboidrati

1.1 Introduzione

I Bacilli sono batteri sporigeni Gram-positivi, aerobi e sono organismi che possiedono una caratteristica comune, ossia quella di essere in grado di differenziare (nel caso in cui le condizioni ambientali fossero particolarmente sfavorevoli) e di indirizzare l'espressione genica verso il processo di sporulazione, portando alla formazione prima di una endospora e poi di una spora libera (dopo lisi cellulare). La spora è una forma di cellula quiescente caratterizzata da diversi strati protettivi che circondano un citoplasma estremamente disidratato[1]. Questa organizzazione strutturale rende le spore estremamente resistenti alle pressioni fisiche e chimiche dell'ambiente esterno ed è in grado di sopravvivere indefinitamente in assenza di acqua e nutrienti [1]. Il suolo è generalmente indicato come l'habitat principale dei batteri aerobi sporigeni, anche se le spore, in realtà, sono state rinvenute in ambienti diversi, tra cui pietre, polvere, ambienti acquatici, e l'intestino di vari insetti e animali [2]. Lavori recenti hanno dimostrato che un ampio numero di sporigeni aerobi possono essere isolati da campioni fecali e intestinali di diversi animali compreso l'uomo. Inoltre è stato dimostrato che possono essere isolati da feci umane provenienti da diverse parti del mondo e da persone con diverse abitudini alimentari, una media di 10^4 unità formanti colonia (CFU) di sporigeni aerobi [2]. Queste osservazioni unite a tutta una serie di dati, indicano che *B.subtilis*, il sistema modello dei batteri sporigeni, può condurre il suo intero ciclo vitale

nell'intestino degli animali [7,8] suggerendo che l'intestino è il reale habitat di tali batteri. Secondo tale teoria, questi batteri sporigeni entrerebbero nel tratto gastro-intestinale (GIT) sottoforma di spora, superando indenni le condizioni estremamente acide presenti nello stomaco, germinerebbero e crescerebbero nella prima parte dell'intestino, sporulerebbero nella parte bassa dell'intestino e verrebbero poi escreti sotto forma di spora [9].

E' noto da tempo che alcuni bacilli aerobi sono pigmentati ed esistono tutta una serie di esempi di ceppi di specie diverse che producono pigmenti differenti. Più recentemente, un gran numero di Bacilli pigmentati sono stati isolati e l'analisi di questi pigmenti ha portato ad identificarli come carotenoidi [19]. Questi carotenoidi, a seconda dei casi, si possono trovare associati sia a cellule vegetative, sia a spore [20], e il loro ruolo predominante è quello di fornire alle cellule vegetative (e/o alle spore) resistenza ai raggi UV e alle specie reattive dell'ossigeno. Proprio grazie a queste loro caratteristiche intrinseche e alla loro forte attività antiossidante, l'utilizzo di carotenoidi di origine vegetale, origine microbica o sintetica, sta trovando diverse potenziali applicazioni nel settore cosmetico, farmaceutico e delle industrie alimentari. Ad esempio, è stato proposto l'uso dei carotenoidi per prevenire l'insorgenza di malattie croniche [21] e ridurre il rischio di cancro [22] nell'uomo e, anche per questo ragione, sono ampiamente commercializzati come integratori alimentari.

Tanto più che i carotenoidi di origine batterica sembrano essere non solo più stabili e resistenti all'azione dei succhi gastrici (Fig.1.1), ma hanno anche una capacità antiossidante molto più forte dei carotenoidi di origine vegetale (come il beta-carotene o il licopene)(Fig.1.2).

Batteri non patogeni, *in grado di colonizzare l' intestino umano* e in grado di produrre carotenoidi sono, quindi, particolarmente consigliabili come integratori alimentari .

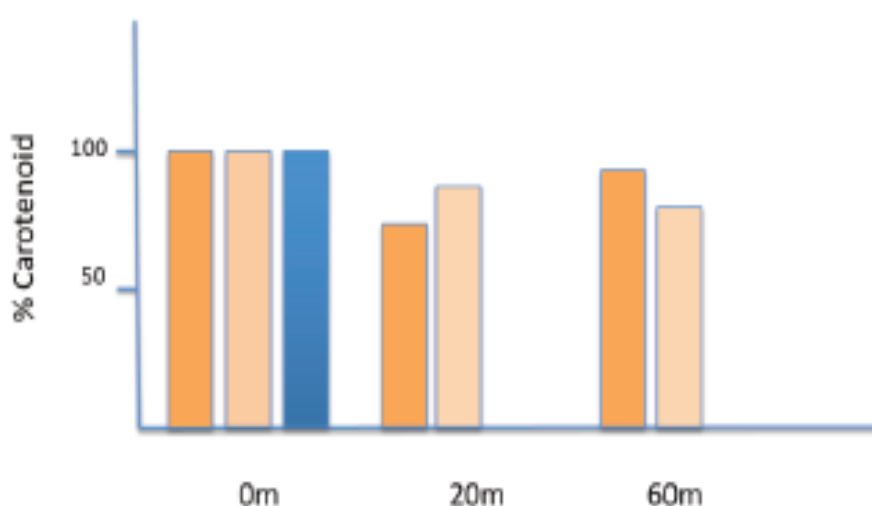


Fig 1.1: carotenoidi dei Bacillus stabili alle condizioni gastriche. Stabilità dei carotenoidi di spore(arancio) o cellule vegetative(rosa) rispetto al β -carotene in blu

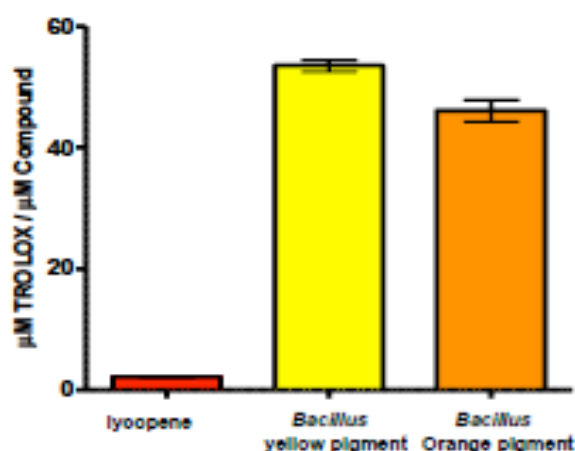


Fig1.2: Forte attività antiossidante dei carotenoidi batterici rispetto al licopene

Due Bacilli pigmentati, *B. firmus* GB1 e *B. indicus* HU36, producono carotenoidi diversi, sia per tipo di struttura che di colore [19], sono stati caratterizzati in dettaglio e i loro genomi completamente sequenziati (file Sequence scaricabile dal link http://www.agf.liv.ac.uk:8088/454/Bacillus_Download/200909/30/).

Entrambi i ceppi sono stati isolati da campioni intestinali umane [6,8] e sono stati proposti come ceppi probiotici [19,20].

In particolare ***Bacillus indicus* HU36** (Fig.1.3B) è un bacillo isolato da feci umane che produce un pigmento giallo-arancio (picco massimo di assorbimento a **455 nm**). Nel caso di questo batterio la colorazione gialla delle cellule cambia in una pigmentazione color arancio nella spora [20]. Questo dato è un'ulteriore indicazione di come i diversi segnali di sviluppo possono influire sul pathway biosintetico del carotenoide. ***Bacillus firmus* GB1** (Fig.1.3A) è un bacillo isolato da ileo umano e produce un pigmento rosa intenso (con picco massimo di assorbimento a **492 nm**) che conferisce una particolare resistenza delle spore all'H₂O₂, di circa quattro volte superiore rispetto ad altri isolati pigmentati (Fig. 1.4) [19]. Ciò molto probabilmente è dovuto all'elevata presenza del carotenoide nelle spore.

Inoltre HU36, GB1 e SF214 non mostrano una riduzione della vitalità cellulare dopo 120 secondi di esposizione ai raggi UV-C. Ciò va in netto contrasto con le spore di *B. subtilis* PY79 che mostrano una forte sensibilità

ai raggi UV-C. Non tutte le spore pigmentate mostrano resistenza ai raggi UV-C [19].

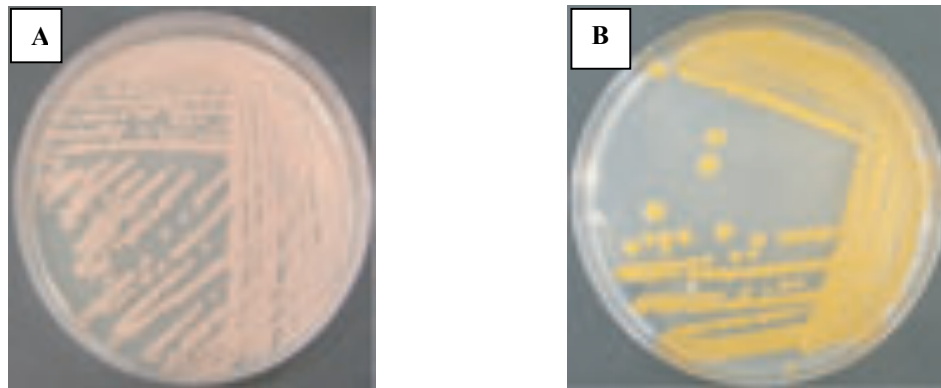


Fig 1.3: Bacilli che presentano diversi tipi di pigmentazione. *Bacillus firmus* GB1 (A) presenta una pigmentazione rosa intenso. *Bacillus indicus* HU36 (B) presenta una pigmentazione giallo-arancio;

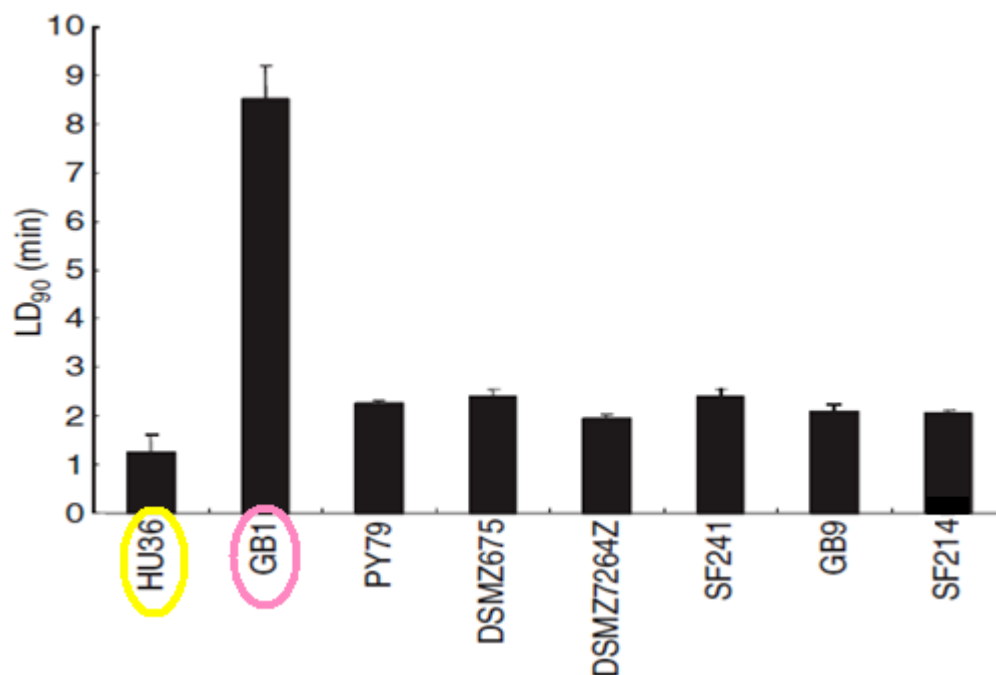


Fig 1.4: Spore di diversi bacilli pigmentati sono stati trattati con H₂O₂ al 5%. **GB1** mostra una resistenza quattro volte superiore rispetto agli altri ceppi a tale trattamento (Khaneja et al., 2010).

Questo lavoro è incentrato prevalentemente sull'annotazione dei putativi Carbohydrate-active enzymes (o CAZymes) di *B.firmus* GB1 e *B.indicus*

HU36. I CAZymes sono enzimi coinvolti nella sintesi e degradazione di carboidrati che, per la grande variabilità dei loro substrati, comprendono una famiglia estremamente vasta di proteine. I CAZymes sono organizzati in una banca dati denominata CAZy <http://www.cazy.org> in **cinque** classi principali: 1) glicosil-idrolasi (GH), comprendente glicosilasi e trans-glicosilasi [23]; 2) glicosil-transferasi (GT), che catalizzano la formazione di legami glicosidici tra residui zuccherini fosfo-attivati e un accettore che può essere un polisaccaride, un lipide o di una proteina [24]; 3) polisaccaril-liasi (PL) che eliminano legami glicosidici attivati, presenti in polisaccaridi acidi [25]; 4) esterasi carboidratiche (CE), che rimuovono un estere [25]; 5) moduli di legame carboidrati (CBM), che sono domini proteici non catalitici [26].

Ciascuna di queste classi sono poi suddivise a loro volta in diverse famiglie, che raggruppano enzimi sulla base strutturale e delle proprietà funzionali. ***Il numero e il tipo di CAZymes effettuata da un organismo è stato utilizzato come marcatore per valutare l'adattamento di tale organismo ad un determinato ambiente.***

Lavori recenti hanno infatti dimostrato come le specie del genere *Bacteroides* [27] e la archeobatterio *Methanobrevibacter smithii* [28] siano organismi idonei a colonizzare l'intestino umano, e tutto basato esclusivamente sul loro profilo CAZy.

1.2 Materiale e Metodi

1.2.1 Condizioni di crescita dei batteri

I Bacilli sono stati coltivati sia in terreno ricco **LB** (per 1 l: 10 g Bacto-triptone, 5 g Bacto-estratto di lievito, 10 g di NaCl, pH 7,0) che in terreno minimo **M9** (Na_2HPO_4 6 g/l, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM, fonte di carbonio 0,2%) in condizioni aerobiche a 37°C.

I Lattobacilli, invece, sono stati coltivati su terreno **Deman, Rogosa e Sharpe (MRS)** (Difco) in condizione anaerobiche, ottenute incubando sia le colture liquide che le colture solide in una camera anaerobica (Oxoid), a 37°C.

1.2.2 Annotazione dei CAZymes

Tutte le ORFs (Open reading frames) dei genomi di *B.firmus* GB1 e *B.indicus* HU36 codificanti per proteine, sono stati sottomessi usando la programmazione della CAZy annotazione, in una procedura divisa in due fasi: 1) *identificazione* e 2) *annotazione*. La fase di identificazione dei CAZymes segue una procedura già descritta in altri lavori [41], in cui le sequenze sono soggette a un'analisi di BLASTp contro una libreria composta da **sequenze full length** di CAZymes, dando in output il numero totale dei CAZymes putativi. I risultati positivi sono poi sottoposti a una

procedura di annotazione modulare, che consiste nell'allineare i CAZymes putativi ottenuti precedentemente, contro le cosiddette “**ModO library**”, ossia contro i singoli moduli catalitici o funzionali, derivati dai CAZy, utilizzando BLASTp o il modello di Markov [42]. Questo secondo step, consente di ottenere la lista dei CAZy divisi per famiglia. Successivamente I risultati sono stati analizzati per verificare la presenza del *peptide segnale* che indicherebbe secrezione della proteina in questione, e sono stati analizzati anche per la presenza di *domini trans-membrana* che indicherebbero un ancoraggio alla membrana stessa [43].

La fase di *annotazione funzionale* è caratterizzata da BLASTp contro una libreria di moduli di proteine derivati da enzimi **caratterizzati biochimicamente** presenti nel database dei Carbohydrate-active enzymes. Il confronto manuale con queste proteine di attività nota ha prodotto tre livelli di annotazione:

- 1) "candidate";
- 2) "related to";
- 3) "distantly related to".

Le diverse diciture sono indicate in relazione alla distanza rispetto agli enzimi funzionalmente caratterizzati, per cui la dicitura “**candidate**” indica una percentuale di identità superiore al 50%, la dicitura “**related to**” indica un’identità maggiore del 30%, mentre la dicitura “**distantly related to**”, indica un’identità inferiore al 30%.

Nelle famiglie è possibile raggruppare enzimi che posseggono attività specifica per substrati differenti, per cui l'annotazione "related to" potrebbe essere migliorata a "candidate" utilizzando una descrizione della funzione più ampia, ad esempio utilizzando la b-glicosidasi, invece di b-mannosidasi.

1.2.3 Produzione di Biofilm

Per testare la produzione di biofilm da parte dei ceppi oggetto del lavoro, sono state utilizzate colture overnight per poi allestire inoculi in mezzo liquido **MSgg**. La composizione del terreno è la seguente:

- 100 mmol l⁻¹ MOPS pH 7,0,
- 0,5% glicerolo,
- 0,5% glutammato,
- 5 mm fosfato di potassio pH 7,0,
- 50 µg ml⁻¹ triptofano,
- 50 mg ml⁻¹ fenilalanina,
- 2 mmol l⁻¹ MgCl₂,
- 0,7 mmol l⁻¹ CaCl₂,
- 50 mmol l⁻¹ FeCl₃,
- 50 mmol l⁻¹ MnCl₂,
- 2 mmol l⁻¹ tiamina,
- 1 micromoli L⁻¹ ZnCl₂.

Le cellule vengono coltivate a 37°C in condizioni statiche per più di 48 ore.

Le cellule in grado di formare uno strato solido all'interfaccia "liquido-aria" sono considerate produttrici di biofilm.

Per quantificare la formazione di biofilm, i batteri sono stati coltivati in terreno MSgg a 37°C per 3 giorni in piastre con 6 pozzetti (micro piastre) di polistirene. Il mezzo di coltura è stato rimosso e i pozzetti sono stati lavati con tampone fosfato salino (PBS) sterile. Lo strato di biofilm solido è stato colorato per 30 min con 2 ml di cristalvioletto allo 0,1% (peso/vol) in una soluzione di isopropanolo-metanolo-PBS (01:01:18 [vol / vol]). I pozzetti sono stati poi lavati di nuovo con dH₂O sterile e lasciati asciugare (circa 30 min). Il cristalvioletto che resta imbrigliato nella matrice (e quindi nei pozzetti) è stato estratto con 2 ml di etanolo-acetone (80:20) e la densità ottica (OD) di ciascun pozzetto è stata misurata a 570 nm. I Risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

1.2.4 Saggi di adesione e degradazione della mucina

La **mucina** è una glicoproteina presente nei secreti mucosi del tratto gastro-intestinale. La glicosilazione delle mucine aumenta gli attriti frizionali tra esse ed il solvente esterno, con conseguente aumento della viscosità della soluzione. In tal modo la mucina, molto viscosa, diviene un elemento protettivo che forma una specie di velo di protezione sull'epitelio gastro-intestinale.

Saggi di adesione alla mucina sono stati eseguiti come descritto in precedenza [Borja et al. 2010]. 100 μ l di una soluzione di *mucina* (da stomaco di suino, tipo III, Sigma-Aldrich) in PBS (10 mg/ml), vengono immobilizzati su piastre composte da 96 pozzetti (micro piastre) di polistirene attraverso un trattamento che prevede l'incubazione delle stesse per un'ora a 37°C, seguita da un'incubazione per una notte a 4°C. Successivamente i pozzetti sono lavati due volte con 200 microlitri di PBS sterile e incubati con 20g/l di *albumina di siero bovino* (BSA) (Sigma-Aldrich), per 2 ore a 4°C. La BSA non legata è eliminata mediante lavaggi estensivi con PBS, dopodiché 100 μ l di cellule batteriche (circa 10⁹ CFU/ml), vengono aggiunti ai pozzetti e il tutto è incubato a 37°C per 1 h. I pozzetti sono poi lavati cinque volte con 200 microlitri di tampone citrato sterile per rimuovere i batteri non legati.

Dopo aver lavato bene le micro piastre e aver rimosso ogni residuo, duecento microlitri di Triton X-100 allo 0,5% (v/v) sono aggiunti per eliminare i batteri legati. Il contenuto di ciascun pozzetto deve essere accuratamente miscelata con una micropipetta, e 100 μ l di sospensione batterica sono stati piastrati al fine di poter effettuare una conta dei batteri legati alla mucina e ottenere valori di CFU/pozzetto. I Risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti. I saggi di degradazione mucina sono stati eseguiti come già precedentemente riportato [39]. Le cellule vengono

cresciute per un over night e successivamente poste su piastre di B-Medium che è così composto:

- triptone (Oxoid) 7,5 g / l;
- casitone (Difco) 7,5 g / l,
- estratto di lievito (Oxoid) 3,0 g / l;
- estratto di carne (Merck) 5,0 g / l;
- NaCl (BDH) 5,0 g / l;
- K₂HPO-3H₂O (BDH) 3,0 g / l;
- KH₂PO (BDH) 0,5 g / l,
- MgSO-7H₂O (BDH) 0,5 g / l;
- cisteina HCl (Sigma) 0,5 g / l;
- resazurina (BDH) 0.002. g / l,
- D-(1)-glucosio (BDH) 10 o 30 g / l,
- purificato mucina gastrica Hog (HGM) 3 g / l,
- agarosio (Sigma) 1,5 g/100 ml.

Il pH del terreno è stato portato ad un valore pari a 7,0 con NaOH 2N.

Le piastre sono incubate per una notte a 37°C in condizioni di aerobiosi.

L'attività di degradazione della mucina è valutata dal diametro dell'alone, osservato dopo aver effettuato la colorazione delle piastre con amido black 0,1% in acido acetico glaciale 3,5 M e lavando poi le stesse con acido acetico glaciale 1,2 M per favorire una lenta decolorazione.

1.3 Risultati

1.3.1 I genomi di *B.indicus* HU36 and *B.firmus* GB1 contengono un numero elevato di CAZymes

I CAZymes putativi in *B.firmus* GB1 e *B.indicus* HU36 sono stati identificati tramite la procedura della “CAZy annotation” e confrontate con quelle di una selezione di Bacilli sporigeni (Tabella 1.1). In entrambi i bacilli sono stati identificati un numero elevato di CAZymes, in particolare 140 in *B.firmus* e 119 in *B.indicus*. I numeri rinvenuti dall’analisi, sono simili al numeri di CAZymes trovati in ceppi di *B.subtilis*/*B.amyloliquefaciens* analizzati, ossia, tutti aventi un numero totale di CAZymes comprese tra 115 e 145 (Tabella 1.1). Un minor numero complessivo di CAZymes è stato ritrovato nelle altre specie sporigene considerate in questo studio (Tabella 1.1). Tra le specie analizzate, ceppi termofili di *Geobacillus* e *Alicyclobacillus* e il ceppo di *B.pseudofirmus* mostrano un numero totale di CAZymes significativamente inferiori rispetto agli altri Bacilli (Tabella 1.1).

Il confronto tra le cinque classi principali di CAZymes, conferma i risultati ottenuti analizzando il numero totale di CAZymes. In particolare, come ceppi del gruppo *B.subtilis*/*B.amyloliquefaciens*, *B.indicus* e *B.firmus* mostrano un elevato numero di glicosil-idrolasi (GH) e moduli di legame ai carboidrati (CBM) e un numero mediocre di glicosil-transferasi (GT), polisaccaril-liasi (PL) e esterasi carboidratiche (CE) (Tabella 1.1).

Tabella 1.1: Analisi comparativa del numero di geni putativi per le cinque categorie di CAZymes nei bacilli sporigeni selezionati.

| Species | GH ^a | GT ^b | PL ^c | CE ^d | CBM ^e | Total |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------|
| <i>Bacillus firmus</i> GB1 | 58 | 42 | 2 | 14 | 24 | 140 |
| <i>Bacillus indicus</i> HU36 | 33 | 48 | 0 | 11 | 27 | 119 |
| <i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 | 43 | 30 | 4 | 14 | 11 | 102 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 | 28 | 48 | 0 | 15 | 13 | 104 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC10987 | 20 | 42 | 0 | 17 | 14 | 93 |
| <i>Bacillus cereus</i> AH187 | 26 | 40 | 0 | 18 | 16 | 100 |
| <i>Bacillus cereus</i> G9842 | 28 | 48 | 0 | 18 | 15 | 109 |
| <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 | 35 | 34 | 2 | 19 | 4 | 94 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii str.W23 | 42 | 37 | 6 | 13 | 27 | 125 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. natto BEST195 | 55 | 38 | 5 | 13 | 34 | 145 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis str.168 | 48 | 40 | 6 | 13 | 24 | 131 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 | 41 | 36 | 3 | 10 | 25 | 115 |
| <i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4 | 22 | 22 | 0 | 9 | 10 | 63 |
| <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 | 19 | 28 | 0 | 8 | 15 | 70 |
| <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 | 29 | 24 | 0 | 12 | 10 | 75 |
| <i>Allycyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. acidocaldarius DSM446 | 29 | 31 | 0 | 9 | 13 | 82 |

GH: Glicosil-idrolasi; GT: Glicosil-Transferasi; PL: Polisaccaril-Liasi; CE: Esterasi Carboidratice; CBM: Moduli di legame ai carboidrati.

Successivamente, abbiamo esteso l'analisi alle varie famiglie che costituiscono ciascuna delle cinque classi CAZyme (file aggiunti 3). Da tale analisi è emerso che, rispetto agli altri Bacilli considerati in questo studio, *B.indicus* e *B.firmus* hanno un elevato numero di CAZymes delle famiglie GH13 GT2, GT4 (Fig 1.5) e alcune famiglie di CAZymes non comuni in altri Bacilli (GH2, GH16, GH31, GH35, GH36, GH66, GH84, GH94, GT5, GT27, GT32, CBM4, CBM13, CBM20, CBM41 e CBM56). (Fig 1.6)

| GH | 1 | 2 | 3 | 4 | 13 | 16 | 18 | 23 | 31 | 32 | 35 | 36 | 42 | 43 | 51 | 66 | 68 | 73 | 84 | 94 | * | Tot |
|------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|-----|
| <i>Bacillus_firmus_GB1</i> | 3 | 1 | 5 | 3 | 19 | 2 | 4 | 4 | 4 | 2 | 0 | 3 | 0 | 1 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 58 |
| <i>Bacillus_indicus_HU36</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 13 | 2 | 1 | 2 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 34 |

| GT | 1 | 2 | 4 | 5 | 27 | 28 | 32 | 35 | 51 | Tot |
|------------------------------|---|----|----|---|----|----|----|----|----|-----|
| <i>Bacillus_firmus_GB1</i> | 2 | 12 | 13 | 2 | 1 | 4 | 0 | 3 | 5 | 42 |
| <i>Bacillus_indicus_HU36</i> | 1 | 14 | 21 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 6 | 48 |

Figura 1.5: esempi di abbondanza delle diverse famiglie in due delle classi principali

| GH | 26 | 30 | 53 | 1 | 23 | 66 | 84 |
|---|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Geobacillus_kaustophilus_HTA426</i> | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Geobacillus_thermodenitrificans_NG80-2</i> | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_clausii_KSM-K16</i> | 0 | 0 | 1 | 3 | 4 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_cereus_ATCC_14579</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_cereus_ATCC_10987</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_pseudofirmus_OF4</i> | 1 | 0 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_pumilus_SAFR-032</i> | 0 | 1 | 1 | 7 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_subtilis_subsp._spizizenii_str._W23</i> | 1 | 0 | 2 | 5 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_subtilis_subsp._natto_BEST195</i> | 1 | 1 | 1 | 5 | 5 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_subtilis_subsp._subtilis_str._168</i> | 1 | 1 | 1 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_amyloliquefaciens_DSM7</i> | 1 | 2 | 1 | 5 | 6 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus_firmus_GB1</i> | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 2 | 0 |
| <i>Bacillus_indicus_HU36</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| <i>Alicyclobacillus_acidocaldarius_DSM_446</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 |

Figura 1.6: confronto tra le famiglie dei ceppi oggetto dello studio e altri presenti in banca dati

Inoltre, abbiamo osservato la presenza in **GB1** e **HU36** di enzimi candidati alla potenziale degradazione di glicani animali. In particolare, GB1 ha due candidati β -N-acetylhexosaminidases (GH3, gb1_67550/68320 e gb1_69350/69360) che possono avere come bersaglio i glicani dell'ospite, nonché le pareti delle cellule batteriche [27], mentre sia GB1 che HU36 hanno vari candidati di N-acetilglucosamina deacetilasi (CE4, gb1_18820, gb1_34880, gb1_38420, gb1_07440, gb1_46210, gb1_68330, ho_00030, ho_24690, ho_10890, ho_27600, ho_27610) e N-acetilglucosaminidasi-6P-deacetilasi (CE9, gb1_66390, ho_21030, ho_39690) in grado di catalizzare l'eliminazione di un gruppo acetilico dall'N-acetilglucosamina del peptidoglicano, così come da glicani animali caratterizzati dalla presenza di zuccheri O-acetilati (per esempio, acidi sialici) [27].

*1.3.2 Correlazione tra il potenziale idrolitico dei genomi di **B.firmus** e **B.indicus** e la crescita su carboidrati selezionati*

I risultati dell'annotazione dei CAZy sono stati comparati al profilo di crescita di *B.firmus* GB1 e *B.indicus* HU36 (Tabella 1.2). In generale sono stati valutati i profili di crescita di entrambi i ceppi su terreno minimo supplementato con monosaccaridi, disaccaridi o cellulosa, in relazione alla presenza di CAZymes specifici nella loro genoma. *B.firmus* GB1 è stato in grado di crescere efficientemente in terreno minimo supplementato con **glucosio, fruttosio, arabinosio, mannosio, xilosio, saccarosio o trealosio**, come previsto dalla presenza di specifici candidati GH. Una crescita minima è stata osservata con **galattosio, lattosio, maltosio e cellulosa**, mentre la crescita non è stata supportata solo dal **fucosio** (Tabella 1.2). *B.indicus* HU36 è stato in grado di crescere in modo efficiente in terreno minimo supplementato con **glucosio, fruttosio, mannosio, maltosio, saccarosio o trealosio**, come previsto, anche in questo caso, dalla presenza di specifici candidati GH. Una lieve crescita è stata sostenuta dal **galattosio**, mentre non è stata osservata in presenza di **arabinosio, fucosio, xilosio, lattosio o cellulosa** come fonti di carbonio in perfetto accordo con l'assenza di specifici candidat GH nel proprio genoma (Tabella 1.2).

| | <i>Bacillus firmus</i> GB1 | | | | <i>Bacillus indicus</i> HU36 | | | |
|-----------|-----------------------------|---------|--------------------------|---------|------------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | Minimal medium ^a | | Rich medium ^b | | Minimal medium ^a | | Rich medium ^b | |
| | growth | pigment | growth | pigment | growth | pigment | growth | pigment |
| NO SUGAR | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Glucose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Fructose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Galactose | +/- | - | + | + | +/- | - | + | + |
| Arabinose | + | - | + | - | - | - | + | + |
| Mannose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Fucose | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Xylose | + | - | + | - | - | - | + | + |
| Lactose | +/- | - | + | +/- | - | - | + | + |
| Maltose | +/- | - | + | +/- | + | - | + | - |
| Sucrose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Trehalose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Cellulose | +/- | - | + | +/- | - | - | + | + |

Tabella 1.2 : Crescita e produzione di pigmento in terreno minimo e terreno ricco.

^aterreno minimo M9; ^bterreno ricco LB

Durante la crescita dei due ceppi non è stata mai osservata produzione e formazione del carotenoide in solido terreno minimo integrato con qualsiasi dei carboidrati analizzato (Tabella 1.2). Quando gli stessi carboidrati selezionati sono stati usati come ulteriore supplemento per il terreno ricco (LB), la crescita dei batteri avveniva comunque, ma la formazione del carotenoide è stata sempre inibita da tutti gli zuccheri in grado di sostenere efficientemente la crescita come unica fonte di carbonio (Tabella 1.2). Il **galattosio** che, come unica fonte di carbonio, consentiva una crescita minima sia a *B.firmus* che a *B.indicus* non influenzava la sintesi dei carotenoidi in entrambi gli organismi (Tabella 1.2), mentre il **lattosio**, **maltosio e cellulosa** anch'essi in grado di supportare una debole crescita di *B.firmus* ha mostrato solo un parziale effetto negativo sulla produzione di carotenoidi (Tabella 1.2).

I risultati schematizzati nella tabella 1.2 sembrano, pertanto, suggerire una sorta di controllo di **repressione da catabolita** sulla biosintesi dei carotenoidi in entrambi i bacilli pigmentati. Un effetto negativo dei carboidrati sulla produzione di carotenoidi non è stato del tutto inatteso. Anche se poco si sa circa la regolazione della biosintesi dei carotenoidi, in batteri non-fotosintetici, è stato precedentemente osservato che la sintesi dei carotenoidi è repressa dal glucosio in varie specie del genere *Erwinia* [29]. Geni di *Erwinia herbicola* clonati in *Escherichia coli* hanno dimostrato di essere controllati da un meccanismo di repressione da cataboliti cAMP-dipendente

[29]. Nel batterio Gram-positivi *Myxococcus xanthus* una forte induzione della produzione di carotenoide luce-dipendente si verifica solo in condizioni di assenza di carbonio [30].

La Figura 1.7 rappresenta gli effetti dell'aggiunta di glucosio 0,5% su terreno ricco agarizzato (LB agar). Oltre a reprimere la produzione del carotenoide, la presenza di glucosio sembra causare anche una riduzione dell'efficienza di crescita. Il medesimo effetto lo si nota per entrambi i ceppi (Fig 1.7).

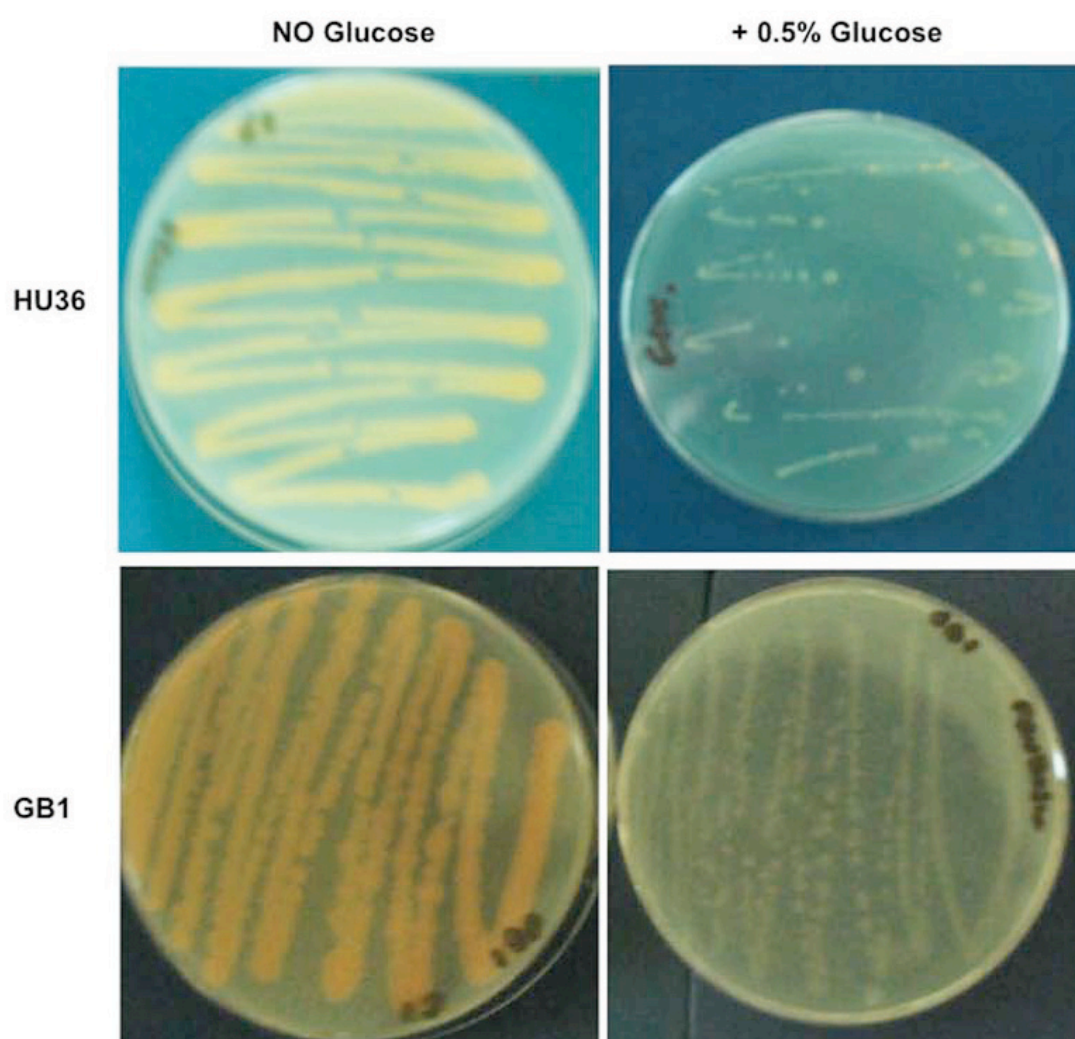


Figura 1.7: crescita dei ceppi pigmentati su terreno ricco agarizzato. Su piastre senza glucosio il carotenoide di solito è visibile dopo 12-18 ore. Piastre implementate con glucosio 0,5% sono stati lasciati a 37°C per 7 giorni per verificare la produzione di carotenoide.

Quando glucosio allo 0,5% è stato aggiunto in terreno ricco liquido (LB), la velocità di crescita di *B.firmus* GB1 e *B.indicus* HU36 non ha subito particolari variazioni, ma al termine della fase di crescita esponenziale è stata osservata lisi cellulare, indicando quindi una morte anticipata delle cellule rispetto alla crescita in terreno ricco liquido (LB) senza aggiunta di glucosio (Figura 1.8A e 1.8B).

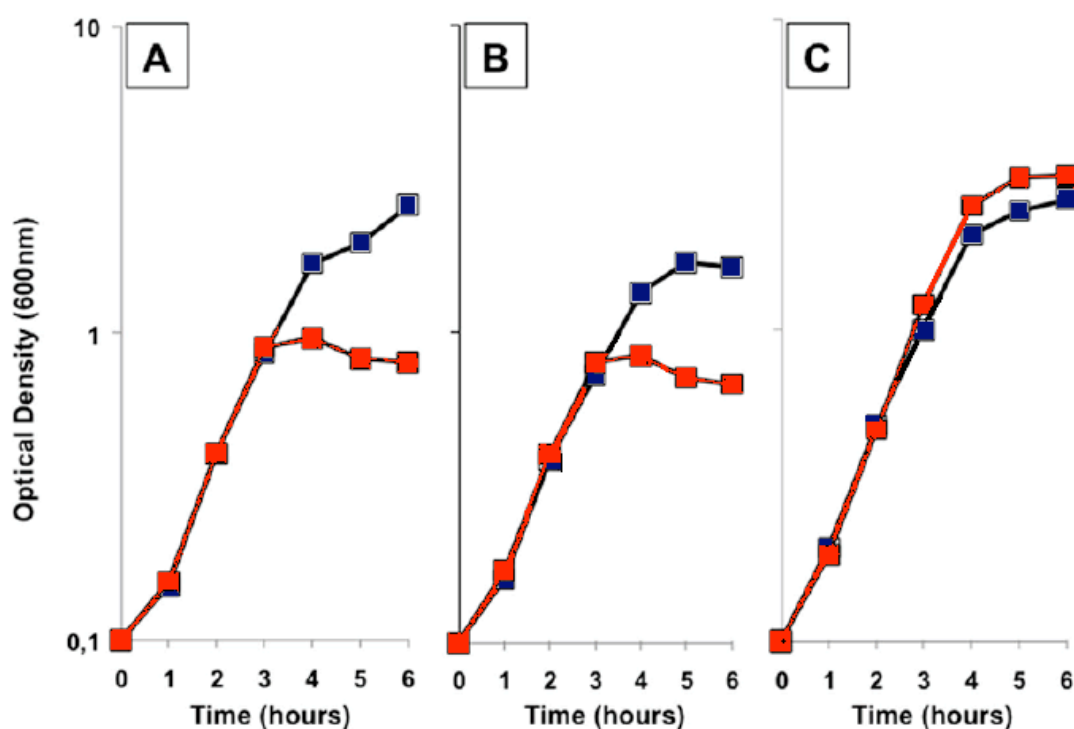


Figura 1.8: crescita dei ceppi pigmentati in terreno ricco liquido. Curva di crescita in LB (quadrati blu) e LB supplementato con 0,5% di glucosio (quadrati rossi) di GB1 (A), HU36 (B) e PY79 (C). La crescita è stata avviata da colture liquide overnight in LB diluito a 0.1 OD₆₀₀

Diminuendo la quantità di glucosio integrato al 0,2% o aumentandolo al 1% (non mostrato), non sono state osservate differenze rilevanti, per entrambi i

ceppi, sia per quanto riguarda la velocità di crescita, sia per quanto riguarda la fase di morte anticipata.

Quando lo stesso esperimento è stato eseguito con un ceppo di *B.subtilis* non pigmentato (PY79) non è stata osservata morte cellulare (Figura 1.8C). È stato precedentemente riportato che durante la fase di crescita esponenziale di *B.subtilis*, fino al 17% di ossigeno utilizzato per il metabolismo può essere trasformato sotto forma di radicali dell'ossigeno e che alla fine della fase esponenziale di crescita, questi ossidanti si accumulano a livelli tali da diventare tossici per il batterio stesso [31].

La resistenza a tali agenti ossidanti è, quindi, il risultato della induzione della risposta allo stress ossidativo [31] che in *B.subtilis* avviene grazie all'azione combinata della **superossido dismutasi SodA** [32] e della **catalasi** delle cellule vegetative **kata** [31]. Come riportato in tabella 1.3, il genoma di *B.firmus* GB1 codifica per un enzima candidato all'attività catalasica, ma non per una superossido dismutasi, mentre il genoma di *B.indicus* HU36 codifica per un enzima candidato all'attività superossido dismutasica ma non per una catalasi.

| Query | <i>B. firmus</i> GB1 | <i>B. indicus</i> HU36 |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| KatA (NP_388762.2) | contig00442 GENE 1 (90% identity) | - |
| SodA (NP_390381.3) | - | contig00407 GENE 23 (49% identity) |

Tabella 1.3: ricerca bioinformatica per la presenza di geni codificanti per proteine omologhe a KatA o di SodA di *B.subtilis*.

Per convalidare parzialmente l'analisi della tabella 1.3 abbiamo misurato l'attività della catalasi dei due ceppi e trovato che mentre le cellule del ceppo HU36 erano catalasi negativi, le cellule del ceppo GB1 erano catalasi positive, anche se la loro attività catalasica era debole rispetto a quella del ceppo di *B. subtilis* PY79. Sulla base di questi dati, abbiamo ipotizzato che la presenza solo di una catalasi (*B. firmus* GB1) o solo di una superossido dismutasi (*B. indicus* HU36) non assicura alle cellule una protezione completa contro forme reattive dell'ossigeno e che la ***produzione di carotenoide è parte essenziale della risposta allo stress ossidativo in entrambi i bacilli pigmentati.*** Pertanto, l'aggiunta di glucosio, reprimendo la biosintesi dei carotenoidi, renderebbe le cellule sensibili alle molecole tossiche ossigeno-derivate, prodotte durante la crescita.

1.3.3 Correlazione tra il potenziale idrolitico dei genomi di B.firmus e B.indicus e la produzione di biofilm.

Entrambi i ceppi *B. firmus* GB1 e *B. indicus* HU36 sono in grado di produrre biofilm sia in terreno liquido che su terreno solido (Figura 1.9A). Ceppi selvatici di *B. subtilis*, che rappresentano il sistema modello dei batteri sporigeni, sono in grado di formare una matrice extracellulare robusta in cui sono racchiusi diverse sottopopolazioni di cellule coinvolte in fenomeni quali la sporulazione, la motilità e la formazione della matrice [33]. La

matrice extracellulare di *B. subtilis* è composto da due principali proteine, ***TasA* e *tapA*** [34,35] e da un ***exopolysaccharide*** (ESP). L'ESP più comune nel biofilm prodotto da *B. subtilis* è il **Levano** [36], che può essere formato sia da unità di D-fruttosio con legame β -2,6 (tipo I) o un polimero di fruttosio con un residuo di glucosio legato al fruttosio terminale da un legame α -glicosidico (tipo II). Il levano è sintetizzato all'esterno della cellula in seguito alla secrezione di una levansaccarasi extracellulare (2,6-b-D-fructan-6-b-D-fruttosil-transferasi), in grado di trasferire il residuo di fruttosio al Levano accettore quando il saccarosio viene utilizzato come substrato [36]. La Formazione di biofilm richiede anche l'azione di levanasi extracellulari (β -D-fructofuranosidase), responsabile della degradazione del levano [36]. Geni per un enzima candidato come levansaccarasi secreta (GH68, ho_13790) e per un candidato come endo-levanase secreta (GH32, ho_44480) sono presenti nel genoma di *B. indicus* HU36.

Il genoma di *B. firmus* GB1, invece, non ha rivelato la presenza di alcun enzima coinvolto nella sintesi di levano ma conteneva geni per un enzima candidato come eso-inulinasi (GH32, gb1_42340 e gb1_42350) (File supplementare 1). Le Eso-inulinasi sono enzimi che idrolizzano residui terminali non ridotti di β -D-fruttofuranosio con legami 2,1 e 2,6 sia all'inulina, sia al Levano che al saccarosio rilascio β -D-fruttosio. Un'enzima candidato alla funzione di fruttano eso-inulinase (GH32, ho_44510) è contenuto anche nel genoma di *B. indicus* HU36.

Sulla base di queste osservazioni possiamo affermare che *B. indicus* HU36 produce un biofilm a base di Levano, mentre ulteriori approfondimenti sperimentali saranno necessari per chiarire la natura dei carboidrati presenti nel biofilm di *B. firmus* GB1.

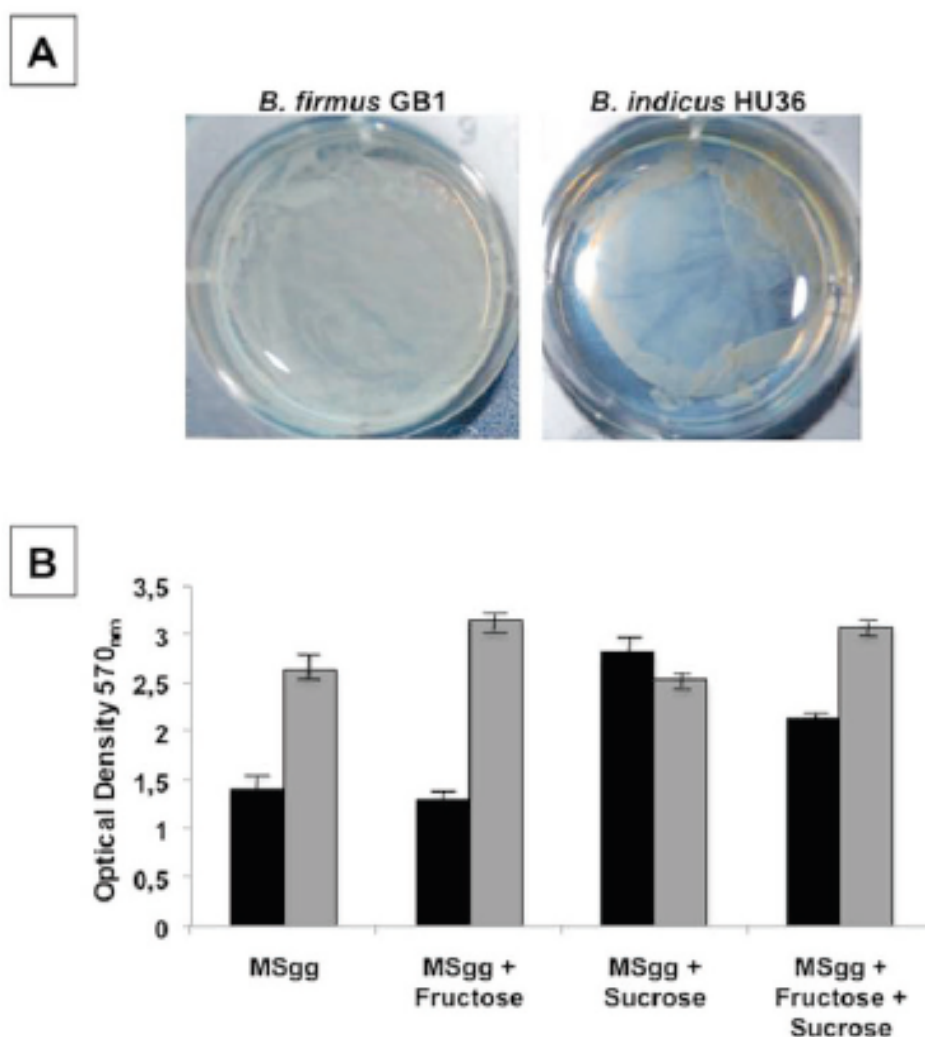


Figura 1.9: formazione del biofilm. (A) biofilm prodotto da *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 su un terreno solido MSgg. Le piastre sono state incubate 4 giorni a 37°C. Il biofilm era visibile dopo circa 3 giorni. (B) la produzione di biofilm da *B. firmus* GB1 (barre nere) e *B. indicus* HU36 (barre grigie) nel terreno liquido MSgg implementato con lo 0,5% di fruttosio o 0,5% di saccarosio oppure fruttosio 0,5% e 0,5% di saccarosio. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

In *B. subtilis* le levansaccarasi sono indotte dalla presenza del saccarosio [35] e le levanasi da basse concentrazioni di fruttosio [35]. Sulla base di

questo abbiamo analizzato la formazione di biofilm di *B. firmus* GB1 e *B. indicus* HU36 in presenza di **saccarosio, fruttosio o entrambi gli zuccheri insieme**. Come mostrato in figura 1.9B, mentre in HU36 la produzione del biofilm (basata sulla produzione di levano) da parte delle cellule non è significativamente influenzata dalla presenza di fruttosio, saccarosio o entrambi i carboidrati, nel ceppo GB1 la sintesi del biofilm da parte delle cellule era circa il doppio in presenza di saccarosio e questa induzione è ridotta dalla presenza concomitante dei due carboidrati (Figura 1.3B). Nelle nostre condizioni standard (MSgg media) *B. indicus* HU36 (barre grigie) è stato più efficiente di *B. firmus* GB1 (barre nere), nella produzione di un biofilm.

*1.3.4 Correlazione tra il potenziale idrolitico dei genomi di **B.firmus** e **B.indicus** e la capacità di legare e degradare la mucina.*

Le mucine sono una famiglia di proteine glicosilate ad alto peso molecolare, abbondantemente prodotte dalle cellule epiteliali eportando alla formazione di uno strato viscoso e mucoso, tipo gel, che ricopre le superfici epiteliali del tratto Gastro-Intestinale dei mammiferi. La parte glicosidica di mucina è formato da oligosaccaridi lineari o ramificati che costituiscono fino al 85% del peso della molecola. Sebbene chimicamente e strutturalmente diverse, le mucine hanno una serie di caratteristiche comuni: tutte, infatti, contengono

grandi quantità di galattosio, ammino-zuccheri, fucosio, hanno gruppi fortemente polari, come acidi neuraminici (sialici) e gruppi solfato al termine della porzione polisaccaridica.

Le mucine possono essere degradate da vari enzimi idrolitici differenti per piccoli oligomeri, monosaccaridi, amminoacidi e questi possono essere utilizzati come fonti di carbonio, azoto ed energia dai **batteri del colon**. È comunemente accettato che la degradazione delle mucine si presenta come una attività di cooperazione della flora intestinale, con batteri diversi in grado di sintetizzare differenti enzimi idrolitici (glicosidasi, proteasi, peptidasi e solfatasi) necessari per una completa degradazione della mucine [37].

A tal proposito, anche l'azione delle deacetilasi ricopre un'elevata importanza, in quanto le deacetilasi sono enzimi necessari per rimuovere gli zuccheri O-acetilati che sono presenti nella porzione terminale dei glicani dell'ospite per prevenire la scissione causata da glicosil-idrolasi microbiche. Batteri che hanno questi enzimi, pertanto, producono zuccheri deacetilati disponibili per loro e per gli altri componenti del microbiota [37].

I risultati relativi all'annotazione dei CAZy suggeriscono che entrambi i Bacilli pigmentati sono in grado di aderire e di degradare la mucina. Il genoma di *B.firmus* GB1 codifica per un polipeptide candidato alla funzione di N-acetil-galattosaminil-transferase, appartenente alla famiglia GT27 (gb1_47520), diversi candidati alla funzione di deacetilasi (gb1_18820,

gb1_34880, gb1_38420, gb1_07440, gb1_46210) della famiglia CE4 e un fosfato-deacetilasi (gb1_66390) della famiglia CE9.

Il genoma di *B.indicus* HU36 codifica per un enzima candidato alla funzione di una N-acetil-b glucosaminidasi secreta (ho_39680) della famiglia GH84, è un Carboidrate-Binding Module (hu_44470) della famiglia CBM13 putativamente in grado di legare la mucina; inoltre ci sono diversi candidati alla funzione di deacetilasi (ho_00030, ho_24690, ho_10890, ho_27600, ho_27610) della famiglia CE4 e fosfato-deacetilasi (ho_21030, ho_39690) della famiglia CE9. Il polipeptide N-acetilgalattosaminil-trasferasi della famiglia GH27 catalizza il trasferimento di N-acetilgalattosamina (GalNAc) da uno zucchero donatore UDP-GalNAc ad un residuo di serina o treonina di un polipeptide accettore, e nei mammiferi sono coinvolti nella fase iniziale di O-glicosilazione delle proteine. La presenza nel genoma di GB1 di un gene codificante per un polipeptide candidato alla funzione di N-acetilgalattosaminil-trasferasi è una scoperta sorprendente e suggerisce la possibilità che GB1 sia in grado di rimodellare glicani dell'ospite o sintetizzare epitopi di carboidrati, che mimano quelle dell'organismo ospite sulla superficie cellulare batterica.

Per convalidare sperimentalmente queste previsioni bioinformatiche, abbiamo analizzato la capacità di entrambi i Bacilli pigmentato di legare e degradare mucina. L'adesione alla mucina è stata valutata utilizzando una metodica già descritta [38]. In breve, 108 CFU sono state incubate in

provette di polistirene pre-trattati con mucina disciolta in PBS, lavate in maniera meticolosa e poi trattati con Triton X-100 per far staccare tutti i batteri che si erano legati alla mucina: Successivamente sono stati piastrati e poi contati dopo un periodo di incubazione .

La Degradazione della mucina è stata valutata mediante un saggio effettuato su piastra già descritto in precedenza [39]. Insieme ai due Bacilli pigmentati abbiamo analizzato, come ceppi di controllo, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), noto per le sue capacità di legarsi alla mucina e essere in grado di degradarla [38] e *L. gasseri* SF1183, per le sue non capacità già dimostrate di degradare la mucina [39]. Come riportato in tabella 1.4 *B. firmus* GB1 aderisce alla mucina con la stessa efficacia di LGG, ma non è in grado di degradarla, mentre *B. indicus* HU36 è circa 10 volte più efficiente di LGG nel legare la mucina ed è anche in grado di degradare in modo efficiente questo glicano tipico dei mammiferi.

Tabella 1.4: Capacità di *B.firmus* e *B.indicus* di legarsi e degradare la mucina.

^aCFU in grado di aderire ai pozzetti di plastica; ND: non rilevabile; ^bI simboli si riferiscono alla dimensione dell'alone di degradazione: - = no alone degrado; + = 1-2 cm; ++ = più a 2 cm.

1.4 Conclusioni

Il risultato principale di questo lavoro riguarda l'annotazione dei CAZymes di due Bacilli produttori di carotenoide. Il genoma di entrambe le specie sporigene contiene un numero elevato di CAZymes putativi, in particolare di glicosil-idrolasi (GH) e moduli di legame ai carboidrati (CBM). Il numero totale di CAZymes e il numero dei membri putativi di ciascuna delle cinque classi di CAZymes, indicano che entrambi i Bacilli, da questo punto di vista, sono molto simili al gruppo di sporigeni appartenenti alle specie di *B.subtilis*/*B.amyloliquefaciens* e diversi da ceppi termofili o basofili facoltativi che presumibilmente vivono in nicchie ambientali particolari e restrittive. **L'analisi sperimentale** delle potenzialità idrolitiche putative di *B.firmus* e *B.indicus* confermano i risultati derivati dall'analisi genomica dei Bacilli, che risultano quindi in grado di degradare e di utilizzare come unica fonte di carbonio, carboidrati diversi. Questa analisi sperimentale ha anche permesso di proporre un modello di un meccanismo tipo ***repressione da catabolita***, che controlla la biosintesi dei carotenoidi in entrambi i ceppi, e che inoltre il carotenoide prodotto sia essenziale per proteggere pienamente le cellule in crescita contro le forme reattive dell'ossigeno.

L'analisi del genoma dei bacilli pigmentati (e i putativi CAZy annotati), ha anche indicato che entrambi i ceppi sono in grado di formare biofilm e di aderire/degradare la mucina di mammifero; il tutto è stato convalidato sperimentalmente.

La produzione di biofilm e quindi di matrice extra-cellulare è stata già precedentemente associata a Bacilli intestinali in grado di persistere all'interno del tratto gastro-intestinale (GIT) per molto tempo [8], mentre la capacità di legarsi a degradare la mucina da parte dei batteri intestinali è ritenuta essere una caratteristica vantaggiosa, in quanto essa consente un turnover della mucina più rapido ed efficiente contribuendo, di conseguenza, all'integrità dell'epitelio intestinale [40]. La capacità di degradare la mucina può anche essere un vantaggio adattativo ed evolutivo per i batteri intestinali, in quanto utilizzando la mucina come fonte di nutrienti, essi riescono a colonizzare la superficie della cellula epiteliale sotto gli strati di muco in modo più efficiente [40].

In conclusione, questi risultati suggeriscono che i due Bacilli pigmentati, l'uno isolato da feci umane (HU36 [8]) e l'altro da un campione umano ileale (GB1 [6]), sono adatti a crescere e colonizzare l'intestino umano.

1.5 Bibliografia

1. Henriques AO, Moran CP Jr: Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Ann Rev Microbiol* 2007, 61:555-588.
2. Hong HA, To E, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM: Defining the natural habitat of *Bacillus* sporeformers. *Res Microbiol* 2009, 160:375-379.
3. Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, Oggioni MR: On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol* 2000, 151:361-368.
4. Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO: Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:968-978.
5. Fakhry S, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L: Characterisation of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 2008, 105:2178-2186.
6. Hong HA, Khanejaa R, Nguyen I, Tam MK, Cazzato A, Tand S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM: *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res Microbiol* 2009, 160:134-143.
7. Casula G, Cutting SM: *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68:2344-2352.
8. Tam NK, Uyen NQ, Hong HA, Duc LH, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO, Cutting SM: The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol* 2006, 188:2692-2700.
9. Cutting SM, Hong HA, Baccigalupi L, Ricca E: Oral Vaccine Delivery by Recombinant Spore Probiotics. *Int Rev Immunol* 2009, 28:487-505.
10. Mitchell C, Iyer S, Skomurski JF, Vary JC: Red pigment in *Bacillus megaterium* spores. *Appl Environ Microbiol* 1986, 52:64-67.

11. Fritze D, Pukall R: Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, 51:35-37.
12. Suresh K, Prabakaran SR, Sengupta S, Shivaji S: *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, 54:1369-1375.
13. Yoon JH, Lee CH, Oh TK: *Bacillus cibi* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, 55:733-736.
14. Agnew MD, Koval SF, Jarrell KF: Isolation and characterisation of novel alkaliphiles from bauxite-processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp. nov., a new obligate alkaliphile. *Syst Appl Microbiol* 1995, 18:221-230.
15. Yoon JH, Kang SS, Lee KC, Kho YH, Choi SH, Kang KH, Park YH: *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, 51:1087-1092.
16. Li Z, Kawamura Y, Shida O, Yamagata S, Deguchi T, Ezaki T: *Bacillus okuhidensis* sp. nov., isolated from the Okuhida spa area of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002, 52:1205-1209.
17. Nielsen P, Fritze D, Priest FG: Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* 1995, 141:1745-1761.
18. Ruger HJ, Koploy JAC: DNA base composition of halophilic and nonhalophilic *Bacillus firmus* strains of marine origin. *Microb Ecol* 1980, 6:141-146.

19. Khaneja R, Perez-Fons L, Fakhry S, Baccigalupi L, Steiger S, To E, Sandmann G, Dong TC, Ricca E, Fraser PD, Cutting SM: Carotenoids found in *Bacillus*. *J. Appl. Microbiol* 2010, 108:1889-1902.
20. Duc LH, Fraser P, Cutting SM: Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *FEMS Microbiol Lett* 2006, 255:215-224.
21. Mares-Perlman JA, Millen AE, Ficek TL, Hankinson SE: The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J Nutr* 2002, 132:518S-524S.
22. Giovannucci E: Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure Appl Chem* 2002, 74:1427-1434.
23. Henrissat B, Davis GJ: Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics. *Plant Physiology* 2000, 124:1515-1519.
24. Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B: A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 1997, 326:929-939.
25. Coutinho PM, Henrissat B: Life with no sugars? *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999, 1:307-308.
26. Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ: Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 2004, 382:769-781.
27. Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, Henrissat B, Coutinho PM, Minx P, Latreille P, Cordum H, Van Brunt A, Kim K, Fulton RS,

- Fulton LA, Clifton SW, Wilson RK, Knight RD, Gordon JI: Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol* 2007, 5:e156.
28. Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, Latreille P, Kim K, Wilson RK, Gordon JI: Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci US* 2007, 104:10643-10648.
29. Perry KL, Simonitch TA, Harrison-Lavoie KJ, Liu ST: Cloning and Regulation of *Erwinia herbicola* Pigment Genes. *J Bacteriol* 1986, 168:607-612.
30. Armstrong GA: Genetics of Eubacterial Carotenoid Biosynthesis: A Colorful Tale. *Annu Rev Microbiol* 1997, 51:629-659.
31. Bol DK, Yasbin RE: Analysis of the Dual Regulatory Mechanisms Controlling Expression of the Vegetative Catalase Gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1994, 176:6744-6748.
32. Inaoka T, Matsumura Y, Tsuchido T: SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1999, 181:1939-1943.
33. Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R: Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 2008, 22:945-953.
34. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R: A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 2006, 59:1229-1238.
35. Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R: An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol Microbiol* 2011, E-published.

36. Marvasi M, Visscher PT, Casillas Martinez L: Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 2010, 313:1-9.
37. Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane JT: Colonization of Mucin by Human Intestinal Bacteria and Establishment of Biofilm Communities in a Two-Stage Continuous Culture System. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:7483-7492.
38. Borja S, Saad N, Schmitter J-M, Bressollier P, Urdaci MC: Adhesive Properties, Extracellular Protein Production, and Metabolism in the *Lactobacillus rhamnosus* GG Strain when Grown in the Presence of Mucin. *J Microbiol Biotechnol* 2010, 20:978-984.
39. Fakhry S, Manzo N, D'Apuzzo E, Pietrini L, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L: Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res Microbiol* 2009, 160:817-823.
40. Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernandez-Garcia M, de los Reyes- Gavilan C, Margolles A: Mucin degradation by *Bifidobacterium* strain isolated from human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:1936-1940.
41. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B: The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 2009, 37 Database: D233-238.
42. Eddy SR: Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 1998, 14:755-763.
43. Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F: A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida*

albicans, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. J Mol Biol 2004, 337:243-253.

Allegato 1

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation

Nicola Manzo¹, Enrica D'Apuzzo¹, Pedro M Coutinho², Simon M Cutting³, Bernard Henrissat² and Ezio Ricca^{1*}

Abstract

Background: Spore-forming *Bacilli* are Gram-positive bacteria commonly found in a variety of natural habitats, including soil, water and the gastro-intestinal (GI)-tract of animals. Isolates of various *Bacillus* species produce pigments, mostly carotenoids, with a putative protective role against UV irradiation and oxygen-reactive forms.

Results: We report the annotation of carbohydrate active enzymes (CAZymes) of two pigmented *Bacilli* isolated from the human GI-tract and belonging to the *Bacillus indicus* and *B. firmus* species. A high number of glycoside hydrolases (GHs) and carbohydrate binding modules (CBMs) were found in both isolates. A detailed analysis of CAZyme families, was performed and supported by growth data. Carbohydrates able to support growth as the sole carbon source negatively effected carotenoid formation in rich medium, suggesting that a catabolite repression-like mechanism controls carotenoid biosynthesis in both *Bacilli*. Experimental results on biofilm formation confirmed genomic data on the potentials of *B. indicus* HU36 to produce a levan-based biofilm, while mucin-binding and -degradation experiments supported genomic data suggesting the ability of both *Bacilli* to degrade mammalian glycans.

Conclusions: CAZy analyses of the genomes of the two pigmented *Bacilli*, compared to other *Bacillus* species and validated by experimental data on carbohydrate utilization, biofilm formation and mucin degradation, suggests that the two pigmented *Bacilli* are adapted to the intestinal environment and are suited to grow in and colonize the human gut.

Background

Spore-forming *Bacilli* are aerobic, Gram positive organisms sharing a common attribute of being able to differentiate into an endospore (spore), a quiescent cell form characterized by several protective layers surrounding a dehydrated cytoplasm [1]. This structural organization makes the spores extremely resistant to external physical and chemical insults and able to survive almost indefinitely in the absence of water and nutrients [1].

The soil is generally indicated as the main habitat of aerobic spore-formers, however, spores have been found in diverse environments including rocks, dust, aquatic environments, and the gut of various insects and animals [2]. Recent reports have highlighted the fact that

large numbers of aerobic spore-formers can be isolated from fecal and intestinal samples of healthy animals [3,4], including humans [5,6]. Hong and colleagues [2] have reported that an average of 10⁴ colony forming units (CFU) of aerobic spore-formers are isolated from human feces collected in different countries and from people with different dietary habits. These observations, together with a series of reports indicating that *B. subtilis*, the model system for spore-formers, can conduct its entire life cycle in the animal gut [7,8], have suggested the hypothesis that the gut is the real habitat of spore-formers [9]. These spore-forming bacteria would enter the mammalian GI-tract in the spore form, safely transit across the stomach, germinate and grow in the upper part of the small intestine, sporulate in the lower part of the intestine and finally be excreted in the spore form [9].

* Correspondence: ericca@unina.it

¹Department of Structural and Functional Biology, Federico II University of Naples, MSA, via Cinthia 4, 80126 Napoli, Italy

Full list of author information is available at the end of the article

It has long been known that some aerobic *Bacilli* are pigmented and examples include strains of *B. megaterium* [10], *B. atrophaeus* [11], *B. indicus* [12], *B. cibi* [13], *B. vedderi* [14], *B. jeotgali* [15], *B. okuhidensis* [16], *B. clarkii* [17], *B. pseudofirmus* [17] and *B. firmus* [18]. More recently, a large number of pigmented *Bacilli* have been isolated and their pigments identified as carotenoids [19]. Those carotenoids, found associated with either vegetative cells or spores [20], are thought to provide resistance to UV irradiation and reactive oxygen species. For their strong antioxidant activity carotenoids of plant, microbial or synthetic origin have several potential applications in the cosmetic, pharmaceutical and food industries. For example, carotenoids have been proposed to prevent the onset of chronic diseases [21] and reduce cancer-risk [22] in humans and, also for this reason, are widely marketed as dietary supplements. Non-pathogenic bacteria, able to colonize the human gut and able to produce carotenoids are, therefore, particularly desirable as food supplements and/or functional food ingredients.

Two pigmented *Bacilli*, *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36, producing pink and yellow/orange carotenoids, respectively [19], have been characterized in detail and their genomes completely sequenced (Sequence files downloadable from http://www.agf.liv.ac.uk:8088/454/Bacillus_Download/200909/30/). Both strains have been isolated from human intestinal samples [6,8] and have been proposed as probiotic strains [19,20].

Here we report the annotation of the carbohydrate active enzymes (CAZymes) of *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36. CAZymes are enzymes involved in the synthesis and degradation of carbohydrates that, for the great variability of their substrates, comprise an extremely vast family of proteins. CAZymes are organized by the CAZy database <http://www.cazy.org> into five main classes: i) glycoside hydrolases (GH), comprising glycosidases and transglycosylases [23], ii) glycosyl transferases (GT), that catalyse the formation of glycosidic bonds between phospho-activated sugar residues and an acceptor such as a polysaccharide, a lipid or a protein [24], iii) polysaccharide lyases (PL) that eliminate activated glycosidic linkages present in acidic polysaccharides [25], iv) carbohydrate esterases (CE), that remove ester-based modifications [25], and v) carbohydrate binding modules (CBM), non-catalytic protein domains [26]. Each of those classes are then sub-divided into several families, that group together enzymes on the base of structural and functional properties. The number and type of CAZymes carried by an organism has been used as a marker to assess the adaptation of that organism to a specific environment. Examples are species of the *Bacteroides* genus [27] and the Archaeon *Methanobrevibacter smithii* [28]

identified as adapted to the human gut mainly based on their CAZy profile.

Results and discussion

B. indicus HU36 and *B. firmus* GB1 genomes contain high numbers of CAZymes

Putative CAZymes in *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 were identified using the CAZy annotation pipeline (Additional Files 1 and 2, respectively) and compared to those of a selection of spore-forming *Bacilli* (Table 1). A total of 140 and 119 CAZymes were identified in the *B. firmus* and *B. indicus* genomes, respectively. This value is similar to the number of CAZymes found in strains of the *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* group, all having a total number of CAZymes ranging between 115 and 145 (Table 1). A lower total number of CAZymes was found in the other spore-forming species considered in this study (Table 1). Among the analyzed species, thermophilic strains of *Geobacillus* and *Alicyclobacillus* and the facultative alkaliphile strain of *B. pseudofirmus* showed a total number of CAZymes significantly lower than the other *Bacilli* (Table 1). A comparison of the five CAZyme classes mostly confirmed the results obtained analyzing the total number of CAZymes. In particular, like strains of the *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* group, *B. indicus* and *B. firmus* showed a high number of glycoside hydrolases (GH) and carbohydrate binding modules (CBM) and average numbers of glycosyl transferases (GT), polysaccharide lyases (PL) and carbohydrate esterases (CE) (Table 1).

Next, we extended the analysis to the various families that constitute each of the five CAZyme classes (Additional File 3). This analysis showed that in comparison with the other *Bacilli* considered in this study, *B. indicus* and *B. firmus* have a high number of CAZymes of the GH13, GT2 and GT4 families and have some CAZymes of families not common in other *Bacilli* (GH2, GH16, GH31, GH35, GH36, GH66, GH84, GH94, GT5, GT27, GT32, CBM4, CBM13, CBM20, CBM41 and CBM56) (Additional File 3).

In addition, we observed the presence in GB1 and HU36 of candidate enzymes for the potential degradation of animal glycans. In particular, GB1 has two candidate β -N-acetylhexosaminidases (GH3, gb1_67550/68320 and gb1_69350/69360) which can target host glycans as well as bacterial cell walls [27], while both GB1 and HU36 have various candidate N-acetylglucosamine deacetylases (CE4, gb1_18820, gb1_34880, gb1_38420, gb1_07440, gb1_46210, gb1_68330, ho_00030, ho_24690, ho_10890, ho_27600, ho_27610) and N-acetylglucosaminidase-6P-deacetylases (CE9, gb1_66390, ho_21030, ho_39690) that can catalyze the elimination of an acetyl group from peptidoglycan N-acetylglucosamine as well

Table 1 Comparative analysis of the number of putative genes for the five CAZyme categories in selected spore-forming *Bacilli*

| Species | GH ^a | GT ^b | PL ^c | CE ^d | CBM ^e | Total |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------|
| <i>Bacillus firmus</i> GB1 | 58 | 42 | 2 | 14 | 24 | 140 |
| <i>Bacillus indicus</i> HU36 | 33 | 48 | 0 | 11 | 27 | 119 |
| <i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 | 43 | 30 | 4 | 14 | 11 | 102 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 | 28 | 48 | 0 | 15 | 13 | 104 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC10987 | 20 | 42 | 0 | 17 | 14 | 93 |
| <i>Bacillus cereus</i> AH187 | 26 | 40 | 0 | 18 | 16 | 100 |
| <i>Bacillus cereus</i> G9842 | 28 | 48 | 0 | 18 | 15 | 109 |
| <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 | 35 | 34 | 2 | 19 | 4 | 94 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii str.W23 | 42 | 37 | 6 | 13 | 27 | 125 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. natto BEST195 | 55 | 38 | 5 | 13 | 34 | 145 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis str.168 | 48 | 40 | 6 | 13 | 24 | 131 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 | 41 | 36 | 3 | 10 | 25 | 115 |
| <i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4 | 22 | 22 | 0 | 9 | 10 | 63 |
| <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 | 19 | 28 | 0 | 8 | 15 | 70 |
| <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 | 29 | 24 | 0 | 12 | 10 | 75 |
| <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. acidocaldarius DSM446 | 29 | 31 | 0 | 9 | 13 | 82 |

^aGH: Glycoside Hydrolases; ^bGT: Glycosyl Transferases; ^cPL: Polysaccharide Lyases; ^dCE: Carbohydrate Esterases; ^eCBM: Carbohydrate Binding Modules

as from animal glycan containing O-acetylated sugars (for example, sialic acids) [27].

The hydrolytic potential of *B. firmus* and *B. indicus* genomes correlates with growth on selected carbohydrates

The CAZy annotation results were compared to the growth profile of *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 (Table 2). Overall the growth profiles of both strains on minimal medium supplemented with selected monosaccharides, disaccharides or cellulose correlated with the presence of related CAZymes in their genome (Additional Files 1 and 2). *B. firmus* GB1 was able to grow

efficiently in minimal medium supplemented with glucose, fructose, arabinose, mannose, xylose, sucrose or trehalose, as expected by the presence of candidate specific GHs (Additional File 4). Weak growth was observed with galactose, lactose, maltose and cellulose, while growth was not supported only by fucose (Table 2 and Additional File 4). *B. indicus* HU36 was able to grow efficiently in minimal medium supplemented with glucose, fructose, mannose, maltose, sucrose or trehalose, as expected by the presence of candidate specific GHs (Additional File 4). Weak growth was supported by galactose while growth was not observed in the presence of arabinose, fucose, xylose, lactose or cellulose as sole

Table 2 Growth and pigment formation in minimal and rich media

| | <i>Bacillus firmus</i> GB1 | | | | <i>Bacillus indicus</i> HU36 | | | |
|-----------|-----------------------------|---------|--------------------------|---------|------------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | Minimal medium ^a | | Rich medium ^b | | Minimal medium ^a | | Rich medium ^b | |
| | growth | pigment | growth | pigment | growth | pigment | growth | pigment |
| NO SUGAR | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Glucose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Fructose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Galactose | +/- | - | + | + | +/- | - | + | + |
| Arabinose | + | - | + | - | - | - | + | + |
| Mannose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Fucose | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Xylose | + | - | + | - | - | - | + | + |
| Lactose | +/- | - | + | +/- | - | - | + | + |
| Maltose | +/- | - | + | +/- | + | - | + | - |
| Sucrose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Trehalose | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Cellulose | +/- | - | + | +/- | - | - | + | + |

^a M9 minimal medium; ^b LB rich medium.

carbon sources in agreement with the absence of candidate specific GHs (Table 2 and Additional File 4).

We never observed carotenoid formation in solid minimal medium supplemented with any of the carbohydrate analyzed (Table 2). When the same selected carbohydrates were used to supplement rich (LB) medium, growth was always allowed but carotenoid formation was inhibited by all sugars able to support efficient growth as sole carbon source (Table 2). Galactose that, as sole carbon source, weakly supported growth of both *B. firmus* and *B. indicus* did not affect carotenoid synthesis in either organisms (Table 2), while lactose, maltose and cellulose were also able to support a weak growth of *B. firmus* and showed a partial negative effect on carotenoid production (Table 2).

Results of Table 2 are, therefore, suggestive of a catabolite repression-like control on carotenoid biosynthesis in both pigmented *Bacilli*. A negative effect of carbohydrates on carotenoid production was not totally

unexpected. Although little is known about the regulation of carotenoid biosynthesis in non-photosynthetic bacteria, it has been previously observed that carotenoid synthesis is repressed by glucose in various species of the genus *Erwinia* [29]. Genes of *Erwinia herbicola* cloned in *Escherichia coli* have been shown to be controlled by a cAMP-dependent catabolite repression mechanism [29]. In the Gram-positive *Myxococcus xanthus* a strong light-dependent induction of carotenoid production only occurs under conditions of carbon starvation [30].

Figure 1 reports the effects of the presence of 0.5% glucose in a rich (LB), solid medium. In addition to repressing carotenoid production, the presence of glucose also appears to reduce the growth of both strains. When 0.5% glucose was added to a liquid, rich (LB) medium, the growth rate of both *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 was not affected but cells lysed at the end of the exponential growth phase (Figure 2AB). No

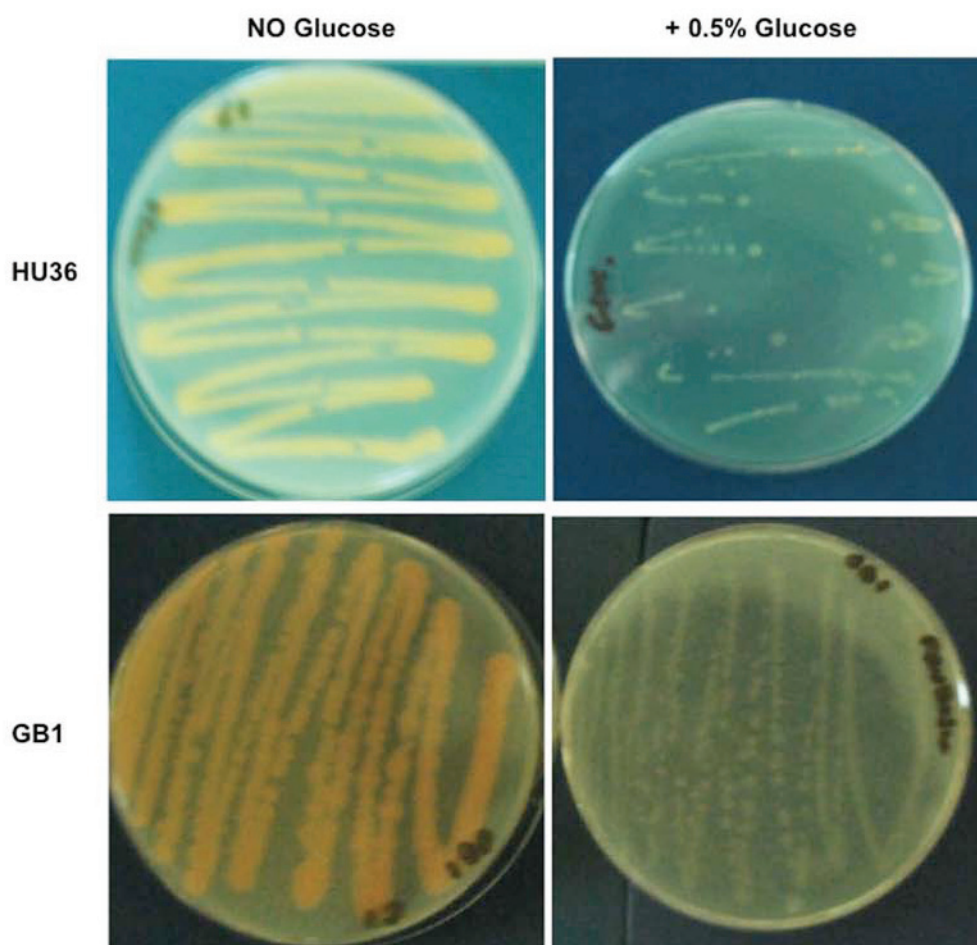


Figure 1 Growth of the pigmented strains in rich solid medium. On plates without glucose carotenoid was usually visible after 12-18 hours. Glucose-supplemented plates were left at 37°C for 7 days to check carotenoid production.

differences were observed in either growth or death rates of both strains by decreasing the amount of supplemented glucose to 0.2% or increasing it to 1% (not shown). When the same experiment was performed with an unpigmented strain of *B. subtilis* (PY79) cell death was not observed (Figure 2C). It has been previously reported that during the exponential growth of *B. subtilis*, as much as 17% of the oxygen used for metabolism can be in the form of oxygen radicals and that at the end of the exponential phase of growth, these oxidants may accumulate to toxic levels [31]. Resistance to those oxidants is, then, the result of the induction of the oxidative stress response [31] that in *B. subtilis* occurs because of the concerted action of the superoxide dismutases SodA [32] and the vegetative catalases KataA [31]. As reported in Table 3, the genome of *B. firmus* GB1 encodes for a candidate enzyme with catalase activity but not for a superoxide dismutase while the genome of *B. indicus* HU36 encodes for a candidate superoxide dismutase but not for a catalase. To partially validate the analysis of Table 3 we measured the catalase activity of the two strains and found that while HU36 cells were catalase negative, GB1 cells were positive, although their catalase activity was weaker than that of *B. subtilis* strain PY79 (data not shown). Based on this, we hypothesize that the presence of only a catalase (*B. firmus* GB1) or only a superoxide dismutase (*B. indicus* HU36) does not ensure full protection of the cells against oxygen reactive forms and that production of carotenoids is an essential part of the oxidative stress response in both pigmented *Bacilli*. Therefore, the addition of glucose, repressing carotenoid biosynthesis, would make cells sensitive to the oxygen-derived toxic molecules produced during growth.

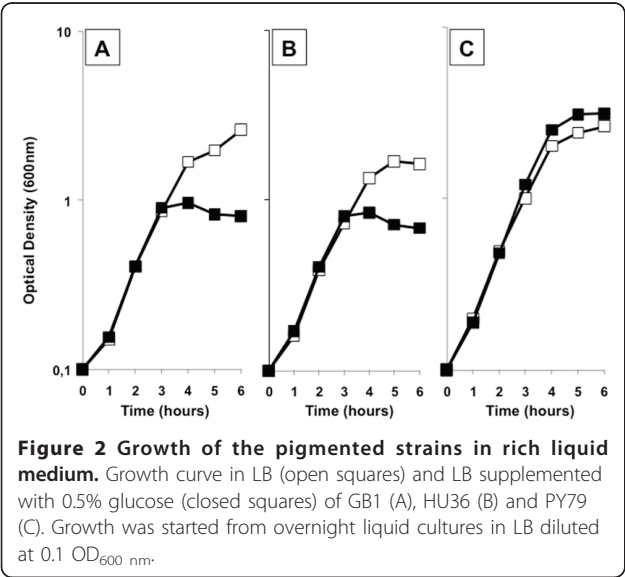


Table 3 Bioinformatic search for the presence of genes coding for proteins homologous to KatA or SodA of *B. subtilis*

| Query | <i>B. firmus</i> GB1 | <i>B. indicus</i> HU36 |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| KatA (NP_388762.2) | contig00442 GENE 1 (90% identity) | - |
| SodA (NP_390381.3) | - | contig00407 GENE 23 (49% identity) |

The hydrolytic potential of *B. firmus* and *B. indicus* genomes correlate with biofilm production

Both *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 form biofilm in liquid and solid (Figure 3A) media. Wild strains of *B. subtilis*, the model system for spore-formers, form a robust extracellular matrix in which diverse subpopulations of cells involved in sporulation, motility and matrix formation are encased [33]. The extracellular matrix of *B. subtilis* is composed of two proteins, TasA and TapA [34,35] and by an exopolysaccharide (ESP). The most common ESP found in biofilm produced by *B. subtilis* is levan [36] which can be formed by either β -2,6-linked D-fructose units (type I) or a fructose polymer with a glucose residue linked to the terminal fructose by α -glycoside bond (type II). Levan is synthesized outside the cell following the secretion of an extracellular levansucrase (2,6- β -D-fructan-6- β -D-fructosyl-transferase), able to transfer the fructose residue to the acceptor levan when sucrose is used as a substrate [36]. Biofilm formation also requires the action of extracellular levanaes (β -D-fructofuranosidase), responsible for levan degradation [36]. Genes for a candidate secreted levansucrase (GH68, ho_13790) and a candidate secreted endo-levanase (GH32, ho_44480) are present in the genome of *B. indicus* HU36 (Additional File 2). The genome of *B. firmus* GB1 did not reveal the presence of enzymes involved in the synthesis of levan but contained the potentials to encode a candidate exo-inulinase (GH32, gb1_42340 and gb1_42350) (Additional File 1). Exo-inulinases are enzymes that hydrolyze terminal, non-reducing 2,1-linked and 2,6-linked β -D-fructofuranose residues in inulin, levan and sucrose releasing β -D-fructose. A candidate fructan exo-inulinase (GH32, ho_44510) is also contained in the genome of *B. indicus* HU36 (Additional File 2).

Based on these observations we suggest that *B. indicus* HU36 produces a levan-based biofilm. Additional experiments will be needed to clarify the nature of the carbohydrate present in the biofilm of *B. firmus* GB1.

In *B. subtilis* levansucrases are induced by sucrose [35] and levanaes by low concentrations of fructose [35]. Based on this we analyzed biofilm formation by *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 in the presence of

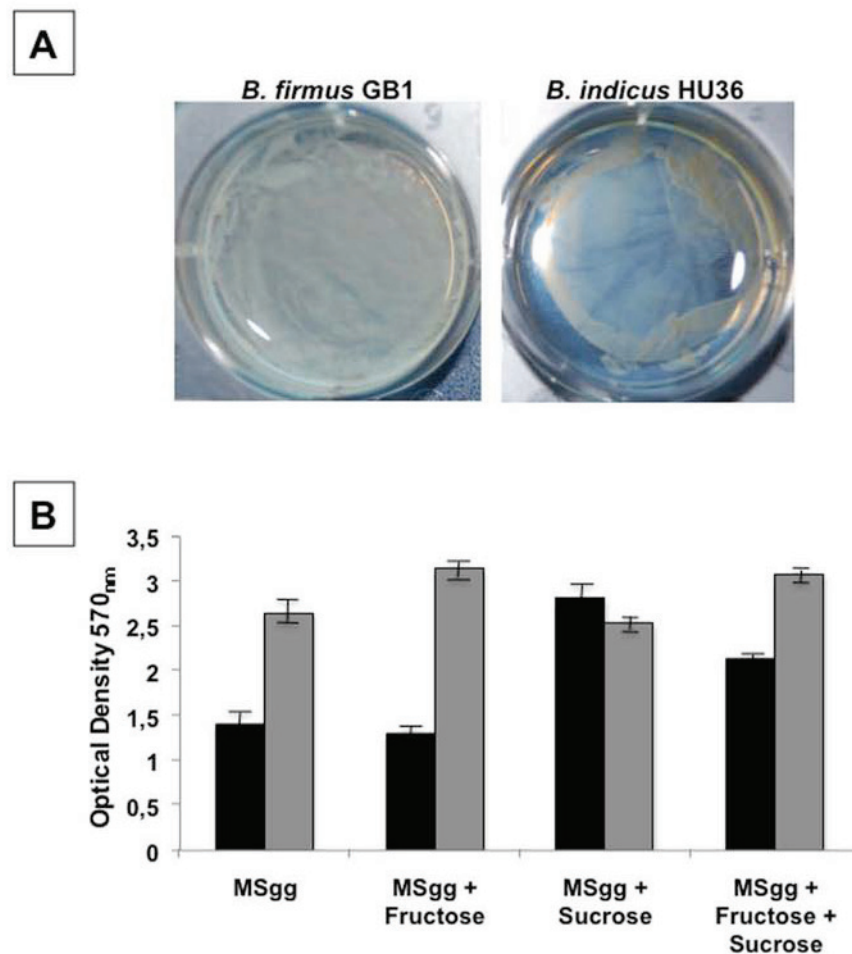


Figure 3 Biofilm formation. (A) Biofilm formed by *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 on a solid MSgg medium. Plates were incubated 4 days at 37°C. Biofilm was visible after about 3 days. (B) Production of biofilm by *B. firmus* GB1 (black bars) and *B. indicus* HU36 (grey bars) in liquid MSgg medium supplemented with 0.5% fructose or 0.5% sucrose or 0.5% fructose and 0.5% sucrose. Data shown are representative of three independent experiments.

sucrose, fructose or both sugars together. As shown in Figure 3B, while in HU36 cells production of the levan-based biofilm was not significantly affected by the presence of fructose, sucrose or both carbohydrates, in GB1 cells biofilm synthesis was about two-fold induced by sucrose and this induction was reduced by the concomitantly presence of the two carbohydrates (Figure 3B). In our standard conditions (MSgg medium) *B. indicus* HU36 (grey bars) was more efficient than *B. firmus* GB1 (black bars) in producing a biofilm.

The hydrolytic potential of *B. firmus* and *B. indicus*

genomes correlate with mucin binding and degradation

Mucins are a family of high molecular weight, heavily glycosylated proteins produced by epithelial cells and forming the viscoelastic gel-like layer that covers the epithelial surfaces in the mammalian GI-tract. The

glycosidic part of mucin is formed by linear or branched oligosaccharides that form up to 85% of the molecule by weight. Although chemically and structurally diverse, mucins invariably contain large quantities of galactose, amino sugars, fucose, have strongly polar groups, such as neuraminic (sialic) acids and sulphate at the end of the polysaccharide moiety. Mucins can be degraded by several different hydrolytic enzymes to smaller oligomers, monosaccharides, and amino acids and used as carbon, nitrogen, and energy sources by colonic bacteria. It is commonly accepted that the breakdown of mucins occurs as a cooperative activity in the gut microbiota with different bacteria able to synthesize the variety of hydrolytic enzymes (glycosidases, proteases, peptidases and sulfatases) needed for a complete degradation of mucins [37]. Also important in this regard is the action of deacetylases, enzymes needed to remove O-acetylated

sugars that are present at the termini of host glycans to prevent direct cleavage by microbial glycoside hydrolases. Bacteria that have these enzymes therefore produce deacetylated sugars available for them and other components of the microbiota [37].

The CAZy annotation results are consistent with the ability of both pigmented *Bacilli* to adhere and degrade mucin. The *B. firmus* GB1 genome encodes a candidate polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, belonging to the GT27 family (gb1_47520) and several candidate deacetylases (gb1_18820, gb1_34880, gb1_38420, gb1_07440, gb1_46210) of the CE4 family and a phosphate-deacetylase (gb1_66390) of the CE9 family (Additional file 1). The *B. indicus* HU36 genome encodes a candidate secreted N-acetyl β -glucosaminidase (ho_39680) of the GH84 family, has a Carbohydrate-Binding Module (hu_44470) of the CBM13 family and several candidate deacetylases (ho_00030, ho_24690, ho_10890, ho_27600, ho_27610) of the CE4 family and phosphate-deacetylases (ho_21030, ho_39690) of the CE9 family (Additional file 2). Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases of family GH27 catalyze the transfer of N-acetylgalactosamine (GalNAc) from the sugar donor UDP-GalNAc to a serine or threonine residue of an acceptor polypeptide and in mammals are involved in the initial step of O-linked protein glycosylation. The presence of a gene coding for a candidate polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase in the genome of GB1 is a surprising finding and suggests the possibility that GB1 is able to either remodel host glycans or synthesize carbohydrate epitopes mimicking those of the host at the bacterial cell surface.

To experimentally validate those bioinformatic predictions we analyzed the ability of both pigmented *Bacilli* to bind and degrade mucin. Adhesion to mucin was assayed as previously described [38]. In brief, 10^8 CFU were incubated in polystyrene tubes pre-treated with mucin, washed extensively and bound bacteria released by treatment with Triton X-100 and plate-counted (Methods). Mucin degradation was assessed by a previously described plate assay [39]. Together with the two pigmented *Bacilli* we analyzed, as control strains, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), known to bind and degrade mucin [38] and *L. gasseri* SF1183, previously shown to be unable to degrade mucin [39]. As reported in Table 4B, *B. firmus* GB1 adhered to mucin with the same efficiency of LGG but was unable to degrade mucin while *B. indicus* HU36 was about 10-fold more efficient than LGG in binding mucin and was also able to efficiently degrade the mammalian glycan.

Conclusions

The primary result of this work is the annotation of the CAZymes of two carotenoid-producing *Bacilli*. The

Table 4 Binding to and degradation of mucin by *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36

| Strains | Mucin adhesion ^a | degradation ^b |
|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>Bacillus firmus</i> GB1 | 2.5×10^3 | - |
| <i>Bacillus indicus</i> HU36 | 30.0×10^3 | ++ |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> SF1183 | ND | - |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | 2.0×10^3 | + |

^a CFU adhered to plastic wells; ND: not detectable; ^b Symbols refers to the size of the degradation halo: - = no degradation halo; + = 1-2 cm; ++ = more than 2 cm.

genome of both the two spore formers contains an elevated number of putative CAZymes, in particular of glycoside hydrolases and carbohydrate binding modules. The total number of CAZymes and the number of putative members of each of the five classes of CAZymes indicated that both *Bacilli* are, and in this respect, similar to the *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* group of spore formers and different from thermophilic or facultative alkaliphile strains, presumably living in restrictive environmental niches.

The experimental analysis of the hydrolytic potential of *B. firmus* and *B. indicus* confirmed the genomic analysis and indicated that both *Bacilli* are able to degrade and use as sole carbon source several different carbohydrates. This experimental analysis also allowed us to propose that in both strains a catabolite repression-like mechanism controls carotenoid biosynthesis and that the produced carotenoid is essential to fully protect the growing cells against oxygen reactive forms.

CAZy analyses of the genomes of the two pigmented *Bacilli*, validated by experimental data, also indicated that both strains are able to form biofilm and adhere/degrade mammal mucin. Biofilm formation has been previously associated to a longer persistence in the GI-tract of intestinal *Bacilli* [8], while the ability to bind to and degrade mucin is believed to be a beneficial feature of intestinal bacteria enabling faster mucin turnover and, as a consequence, contributing to the integrity of the intestinal epithelium [40]. The ability to degrade mucin may also be an adaptive advantage for intestinal bacteria, where using mucin as a source of nutrients, can more efficiently colonize the epithelial cell surface underneath the mucus layers [40].

In conclusion, our results suggest that the two pigmented *Bacilli*, isolated from human feces (HU36 [8]) and a human ileal sample (GB1 [6]), are adapted to the intestinal environment and suited to grow and colonize the human gut.

Methods

Bacterial growth conditions

Bacilli were grown either in LB medium (for 1 l: 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-yeast extract, 10 g NaCl, pH

7.0) or in minimal M9 medium (Na_2HPO_4 6 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 0.5 g/l, NH_4Cl 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM, carbon source 0.2%) in aerobic conditions at 37°C. *Lactobacilli* were grown on deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) (Difco) medium in anaerobic condition, obtained by incubating liquid and solid cultures in an anaerobic chamber (Oxoid), at 37°C.

CAZY annotation

All protein-encoding ORFs from the *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 genomes were submitted for analysis using the CAZY annotation pipeline in a two-step procedure of identification and annotation. The identification step of CAZymes followed a procedure previously described [41], where sequences are subject to BLASTp analysis against a library composed of modules derived from CAZY. The positive hits are then subjected to a modular annotation procedure that maps the individual modules against on the peptide using comparisons against libraries of catalytic and carbohydrate models derived from CAZY using BLASTp or Markov models [42]. The results were analyzed for the presence of signal peptide indicating enzyme's secretion and trans membrane domains indicating a membrane anchor, [43]. The functional annotation step involved BlastP comparisons against a library of protein modules derived from the biochemically characterized enzymes found in the Carbohydrate-active enzymes database. The manual comparison with these proteins of known activity yielded three levels of annotation: i) "candidate" activity, ii) "related to" activity and iii) "distantly related to" activity as a function of the distance with functionally characterized enzymes (> 50% identity for candidate, > 30% for related to and less than 30% for distantly related to). In families known to group together enzymes of differing substrate specificity, the "related to" annotation could be upgraded to "candidate" by using a broad activity descriptor, for instance β -glycosidase instead of β -mannosidase.

Biofilm production

To test biofilm production overnight cultures were used to inoculate liquid MSgg medium (100 mmol l⁻¹ MOPS pH 7.0, 0.5% glycerol, 0.5% glutamate, 5 mm potassium phosphate pH 7.0, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tryptophan, 50 mg ml⁻¹ phenylalanine, 2 mmol l⁻¹ MgCl_2 , 0.7 mmol l⁻¹ CaCl_2 , 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ FeCl_3 , 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ MnCl_2 , 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ thiamine, 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ZnCl_2) [5] and cells grown at 37°C in static conditions for up to 48 h. Cells forming a solid layer at the liquid-air interface were considered as biofilm producers. To quantify biofilm formation, bacteria were grown in MSgg medium at 37°C for 3 days in 6-wells polystyrene microtiter plates. Culture medium was removed and wells washed with phosphate-buffered

saline (PBS). The solid biofilm layer was stained for 30 min with two ml 0.1% (wt/vol) crystal violet in an isopropanol-methanol-PBS solution (1:1:18 [vol/vol]). Wells were then washed again with dH₂O and air-dried (about 30 min). The crystal violet bound to the wells was extracted with 2 ml ethanol-acetone (80:20) and the optical density (OD) of each well was measured at 570 nm.

Mucin adhesion and degradation assays

Mucin adhesion assays were performed as previously described [Borja et al. 2010]. 100 μl of a mucin (from porcine stomach type III; Sigma-Aldrich) solution in PBS (10 mg/ml) was immobilized on the wells of 96-well polystyrene microtiter plates for one hour at 37°C, followed by overnight incubation at 4°C. Wells were washed twice with 200 μl of PBS and incubated with 20 g/l bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich), for 2 h at 4°C. Non-bound BSA was eliminated by extensive washes with PBS, and 100 μl of bacterial cell suspensions (approximately 10⁹ CFU/ml), was added to the wells and incubated at 37°C for 1 h. Wells were washed five times with 200 μl of sterile citrate buffer to remove unbound bacteria. Two hundred μl of 0.5% (v/v) Triton X-100 was added to eliminate attached bacteria. The content of each well was thoroughly mixed with a micropipette, and 100 μl of the resulting suspensions plated to obtain the CFU/well. Results are the average of three independent experiments.

Mucin degradation assays were performed as previously reported [Fakhry et al., 2009]. Cells were grown overnight and spotted on Medium B plates: tryptone (Oxoid) 7.5 g/l; casitone (Difco) 7.5 g/l; yeast extract (Oxoid) 3.0 g/l; meat extract (Merck) 5.0 g/l; NaCl (BDH) 5.0 g/l; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 3.0 g/l; KH_2PO_4 (BDH) 0.5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0.5 g/l; cysteine HCl (Sigma) 0.5 g/l; resazurin (BDH) 0.002 g/l; D-(1)-glucose (BDH) 10 or 30 g/l, purified hog gastric mucin (HGM) 3 g/l and agarose (Sigma) 1.5 g/100 ml. The pH of medium was adjusted to 7.0 with 2 N NaOH. Mucin degradation activity was evaluated by the diameter of the halo observed after plate staining with amido black 0.1% in glacial acetic acid 3.5 M and washing with glacial acetic acid 1.2 M.

Additional material

Additional file 1: Functional CAZY annotation for strain *B. firmus* GB1; excel file; lists all CAZymes found in the genome of *B. firmus* GB1.

Additional file 2: Functional CAZY annotation for strain *B. indicus* HU36; excel file; lists all CAZymes found in the genome of *B. indicus* HU36.

Additional file 3: Analysis to the various families that constitute each of the five CAZyme classes; excel file; lists all families of each

class of CAZymes found in *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 and compare them to those of 14 selected *Bacilli*.

Additional file 4: Candidate glycoside hydrolases active against specific carbohydrates; excel file; lists glycoside hydrolases found in *B. firmus* GB1 and *B. indicus* HU36 grouping them for the specific carbohydrate they hydrolyze.

Acknowledgements

WE thank M. Moracci for careful reading of the manuscript. This research was supported by a EU grant (KBBE-2007-207948) from the EU 7th Framework to SMC and ER.

Author details

¹Department of Structural and Functional Biology, Federico II University of Naples, MSA, via Cinthia 4, 80126 Napoli, Italy. ²Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR6098, CNRS and Universités d'Aix-Marseille I & II, Case 932, 163 Av de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France. ³School of Biological Sciences, Royal Holloway University of London, Egham, Surrey TW20 0EX, UK.

Authors' contributions

All authors read and approved the final version of the paper. NM was the main author of the paper and participated in CAZy annotation and experimental validation. ED contributed to the experimental work on biofilm formation. PMC participated and supervised the CAZy annotation. SMC contributed to the interpretation of the results. BH participated and supervised the CAZy annotation and contributed to the manuscript. ER supervised the experimental work and contributed to the manuscript.

Received: 4 July 2011 Accepted: 5 September 2011

Published: 5 September 2011

References

- Henriques AO, Moran CP Jr: **Structure, assembly, and function of the spore surface layers.** *Ann Rev Microbiol* 2007, **61**:555-588.
- Hong HA, To E, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM: **Defining the natural habitat of *Bacillus* sporeformers.** *Res Microbiol* 2009, **160**:375-379.
- Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, Oggioni MR: **On the fate of ingested *Bacillus* spores.** *Res Microbiol* 2000, **151**:361-368.
- Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO: **Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:968-978.
- Fakhry S, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L: **Characterisation of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract.** *J Appl Microbiol* 2008, **105**:2178-2186.
- Hong HA, Khaneja R, Nguyen I, Tam MK, Cazzato A, Tand S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM: ***Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract.** *Res Microbiol* 2009, **160**:134-143.
- Casula G, Cutting SM: ***Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:2344-2352.
- Tam NK, Uyen NQ, Hong HA, Duc LH, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO, Cutting SM: **The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives.** *J Bacteriol* 2006, **188**:2692-2700.
- Cutting SM, Hong HA, Baccigalupi L, Ricca E: **Oral Vaccine Delivery by Recombinant Spore Probiotics.** *Int Rev Immunol* 2009, **28**:487-505.
- Mitchell C, Iyer S, Skomurski JF, Vary JC: **Red pigment in *Bacillus megaterium* spores.** *Appl Environ Microbiol* 1986, **52**:64-67.
- Fritze D, Pukall R: **Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**:35-37.
- Suresh K, Prabakaran SR, Sengupta S, Shivaji S: ***Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, **54**:1369-1375.
- Yoon JH, Lee CH, Oh TK: ***Bacillus cibi* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, **55**:733-736.
- Agnew MD, Koval SF, Jarrell KF: **Isolation and characterisation of novel alkaliphiles from bauxite-processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp. nov., a new obligate alkaliphile.** *Syst Appl Microbiol* 1995, **18**:221-230.
- Yoon JH, Kang SS, Lee KC, Kho YH, Choi SH, Kang KH, Park YH: ***Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**:1087-1092.
- Li Z, Kawamura Y, Shida O, Yamagata S, Deguchi T, Ezaki T: ***Bacillus okuhidensis* sp. nov., isolated from the Okuhida spa area of Japan.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2002, **52**:1205-1209.
- Nielsen P, Fritze D, Priest FG: **Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species.** *Microbiology* 1995, **141**:1745-1761.
- Ruger HJ, Koploy JAC: **DNA base composition of halophilic and nonhalophilic *Bacillus firmus* strains of marine origin.** *Microb Ecol* 1980, **6**:141-146.
- Khaneja R, Perez-Fons L, Fakhry S, Baccigalupi L, Steiger S, To E, Sandmann G, Dong TC, Ricca E, Fraser PD, Cutting SM: **Carotenoids found in *Bacillus*.** *J. Appl. Microbiol* 2010, **108**:1889-1902.
- Duc LH, Fraser P, Cutting SM: **Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers.** *FEMS Microbiol Lett* 2006, **255**:215-224.
- Mares-Perlman JA, Millen AE, Ficek TL, Hankinson SE: **The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview.** *J Nutr* 2002, **132**:518S-524S.
- Giovannucci E: **Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature.** *Pure Appl Chem* 2002, **74**:1427-1434.
- Henrissat B, Davis GJ: **Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics.** *Plant Physiology* 2000, **124**:1515-1519.
- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B: **A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities.** *Biochem J* 1997, **326**:929-939.
- Coutinho PM, Henrissat B: **Life with no sugars? *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999, **1**:307-308.**
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ: **Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition.** *Biochem J* 2004, **382**:769-781.
- Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, Henrissat B, Coutinho PM, Minx P, Latreille P, Cordum H, Van Brunt A, Kim K, Fulton RS, Fulton LA, Clifton SW, Wilson RK, Knight RD, Gordon JL: **Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine.** *PLoS Biol* 2007, **5**:e156.
- Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, Latreille P, Kim K, Wilson RK, Gordon JL: **Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut.** *Proc Natl Acad Sci US* 2007, **104**:10643-10648.
- Perry KL, Simonitch TA, Harrison-Lavoie KJ, Liu ST: **Cloning and Regulation of *Erwinia herbicola* Pigment Genes.** *J Bacteriol* 1986, **168**:607-612.
- Armstrong GA: **Genetics of Eubacterial Carotenoid Biosynthesis: A Colorful Tale.** *Annu Rev Microbiol* 1997, **51**:629-659.
- Bol DK, Yasbin RE: **Analysis of the Dual Regulatory Mechanisms Controlling Expression of the Vegetative Catalase Gene of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 1994, **176**:6744-6748.
- Inaoka T, Matsumura Y, Tsuchido T: **SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 1999, **181**:1939-1943.
- Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R: **Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community.** *Genes Dev* 2008, **22**:945-953.
- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R: **A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix.** *Mol Microbiol* 2006, **59**:1229-1238.
- Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R: **An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms.** *Mol Microbiol* 2011, E-published.
- Marvasi M, Visscher PT, Casillas Martinez L: **Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis.** *FEMS Microbiol Lett* 2010, **313**:1-9.
- Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane JT: **Colonization of Mucin by Human Intestinal Bacteria and Establishment of Biofilm Communities in a Two-Stage Continuous Culture System.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:7483-7492.

38. Borja S, Saad N, Schmitter J-M, Bressollier P, Urdaci MC: **Adhesive Properties, Extracellular Protein Production, and Metabolism in the *Lactobacillus rhamnosus* GG Strain when Grown in the Presence of Mucin.** *J Microbiol Biotechnol* 2010, **20**:978-984.
39. Fakhry S, Manzo N, D'Apuzzo E, Pietrini L, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L: **Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium.** *Res Microbiol* 2009, **160**:817-823.
40. Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernandez-Garcia M, de los Reyes-Gavilan C, Margolles A: **Mucin degradation by *Bifidobacterium* strain isolated from human intestinal microbiota.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:1936-1940.
41. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B: **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37** Database: D233-238.
42. Eddy SR: **Profile hidden Markov models.** *Bioinformatics* 1998, **14**:755-763.
43. Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F: **A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*.** *J Mol Biol* 2004, **337**:243-253.

doi:10.1186/1471-2180-11-198

Cite this article as: Manzo et al.: Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation. *BMC Microbiology* 2011 **11**:198.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CAPITOLO 2

Pigmentazione e sporulazione sono destini cellulari
alternativi in
Bacillus pumilus SF214

2.1 Introduzione

I Bacilli sono batteri sporigeni, aerobi, Gram positivi caratterizzati dalla capacità di differenziare in endospore (spore), un tipo di cellule metabolicamente quiescenti ed estremamente resistenti. Il suolo è generalmente indicato come l'habitat principale di aerobi sporigeni, però, le spore sono state ritrovate in molti ambienti diversi, tra cui pietre, polvere, ambienti acquatici, e l'intestino di vari insetti e animali (Hong et al, 2009; Taglio et al., 2009). Tale ampia distribuzione ambientale è facilitata dalla possibilità delle spore di sopravvivere a lungo termine, in assenza di acqua e nutrienti e sopportare habitat estremi che potrebbero uccidere altre cellule allo stato vegetativo (Nicholson et al., 2000). La capacità di sopravvivenza è dovuta alla particolare struttura della spora che è formata da un nucleo, contenente un citoplasma disidratato e un cromosoma condensato e inattivo, e da una serie di strati protettivi.

Il primo strato è un cortex ricco in peptidoglicano che è circondato da diversi strati sovrapposti di materiale proteico, il coat e, in alcune specie, la esosporio (Henriques e Moran, 2007; McKenney et al, 2013). Queste strutture proteggono la spore dalle radiazioni UV, da condizioni estreme di calore o di pH, dall'esposizione a solventi, dal perossido di idrogeno, da sostanze chimiche tossiche e da enzimi litici (Nicholson et al, 2000; Setlow, 2006).

In presenza di acqua e nutrienti e quando le condizioni ambientali risultano favorevoli al batterio e adeguate, le spore germinano. La germinazione è un processo rapido che causa la rottura e la rimozione delle strutture di protezione e permette la ripresa e la crescita cellulare vegetativa (Nicholson et al, 2000;. Henriques e Moran, 2007).

La formazione delle spore dipende dalle condizioni ambientali che non consentono la crescita cellulare e non sono favorevoli alla sopravvivenza del batterio, come ad esempio un blocco di replicazione del DNA e una diminuzione dei nutrienti disponibili (Lopez et al., 2009a). In *Bacillus subtilis*, l'organismo modello per i batteri sporigeni, le cellule in attiva fase di crescita si ritrovano prevalentemente singole e estremamente mobili. Quando queste cellule disperse raggiungere la fine della fase esponenziale di crescita, possono seguire percorsi di sviluppo alternativi con alcune cellule che formano lunghe catene, producendo una matrice extra-cellulare che si assembla a formare biofilm multicellulari, e altre cellule che entrano nel programma (irreversibile) di formazione di spore (Vlamakis et al, 2008; Chai et al, 2010; Chai et al, 2011). Pertanto, nell'ambito di una popolazione, la produzione di matrice e il processo di sporulazione, sono sorti cellulari mutuamente esclusive (Vlamakis et al, 2008; Lopez et al, 2009b) e sono entrambi processi bistabili in cui le cellule seguono o l'uno o l'altro percorso (Chai et al, 2008. , Veening et al, 2008). Entrambi i destini di sviluppo delle cellule sono disciplinate dalla stessa proteina regolatrice, **Spo0A-P**, che attiva direttamente i geni della via di

sporulazione (Fujita et al, 2005) e agisce indirettamente sulla sintesi della matrice, alleviando la repressione di geni coinvolti nella produzione di matrice (operoni *epsA-O* e *yqxM-sipW-tasA*) (Branda et al, 2006; Chu et al, 2006; Romero et al, 2010). Due meccanismi cooperano al fine di rendere i meccanismi di sporulazione e di produzione della matrice mutualmente esclusivi:

un controllo metabolico mediato dai livelli intracellulari di SpoOA-P e il numero di copie del cromosoma sono meccanismi che impediscono alle cellule che sono entrati nel processo di sporulazione di esprimere geni che causano la produzione di matrice (Chai et al, 2011.).

Bassi livelli di SpoOA-P inducono, la formazione della matrice, mentre un alto livello di fosfoproteina blocca la formazione della matrice e attiva la sporulazione. Pertanto, in un mezzo che induce la sporulazione, in cui SpoOA-P raggiunge rapidamente elevati livelli di concentrazione, le cellule entrano direttamente nella fase di sporulazione invece di formare biofilm. Al contrario, in un mezzo in cui SpoOA-P rimane a bassa concentrazione, viene promossa la formazione di biofilm (Chai et al., 2011). Tuttavia, la produzione di matrice extracellulare e la sporulazione sono processi collegati. È stato dimostrato che KinD, un sensore di membrana istidina-chinasi e un componente fosfo-trasferasico del pathway di Spo0A, agisce come una proteina checkpoint in grado di regolare l'insorgenza di sporulazione inibendo l'attività di Spo0A. KinD altererebbe la sua attività, a seconda della presenza o assenza della

matrice extracellulare agendo quindi su Spo0A per regolare l'espressione dei geni coinvolti nella produzione di matrice e nel processo di sporulazione (Aguillar et al, 2010). Nell'ambito del biofilm coesistono diversi tipi cellulari che mostrano un elevato grado di organizzazione spaziotemporale, con cellule produttrici di matrice che poi in ultima analisi si differenziano in spore (Vlamakis et al, 2008).

Mentre *B.subtilis* non è pigmentato, isolati di varie specie appartenenti al genere *Bacillus* sono pigmentati e, nella maggior parte dei casi, tali pigmenti sono stati identificati come carotenoidi e proposti per fornire resistenza a radiazioni UV e specie reattive dell'ossigeno (Duc et al, 2006;. Khaneja et al, 2010;. Manzo et al, 2011;. Steiger et al, 2012). Un ceppo pigmentato di *Bacillus pumilus*, SF214, (Fig. 2.1) isolato da un campione marino, è stato precedentemente descritto (Khaneja et al., 2010).

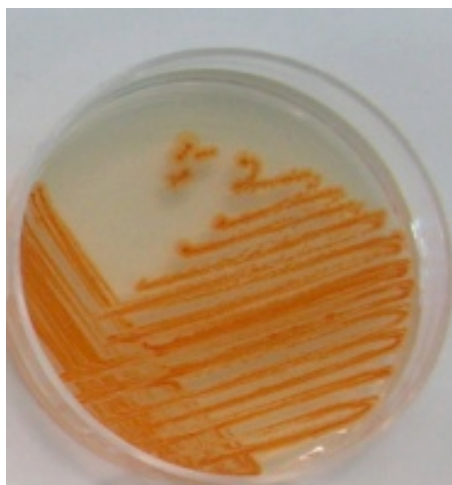


Fig 2.1: *Bacillus pumilus* SF214 che presenta una pigmentazione rosso-arancio.

SF214 è un batterio alofilo con la capacità di formare moderate quantità di matrice extra-cellulare e di produrre un pigmento rosso-arancio idrosolubile, cioè un pigmento che non può essere estratto (insolitamente) attraverso l'utilizzo di solventi organici, ma viene mantenuto nella fase acquosa (Khaneja et al., 2010). L'incapacità di partizione di questo pigmento in solventi organici, impedendone un'analisi mediante HPLC per ottenere caratteristiche del carotenoide tramite spettri UV/VIS, ha precluso la sua assegnazione definitiva alla specie dei carotenoidi (Khaneja et al., 2010). Tuttavia, il picco spettrale a 410 nm mostrato da estratti acquosi SF214 (Khaneja et al., 2010) è idoneo a costituire una proteina associata a un carotenoide, come precedentemente descritto per caroteno-proteine estratte da gambero (Cremades et al., 2001). SF214 mostra anche una elevata capacità di resistere a esposizioni prolungate (fino a 120 secondi) ai raggi UV-C. Ciò va in netto contrasto con le spore di *B. subtilis* PY79 che mostrano una forte sensibilità ai raggi UV-C. La formazione del pigmento di SF214 inoltre è strettamente legata alla temperatura di crescita, per cui a 25°C il batterio sviluppa un pigmento rosso-arancio, mentre a 42°C si formano colonie completamente bianche (Fig 2.2).

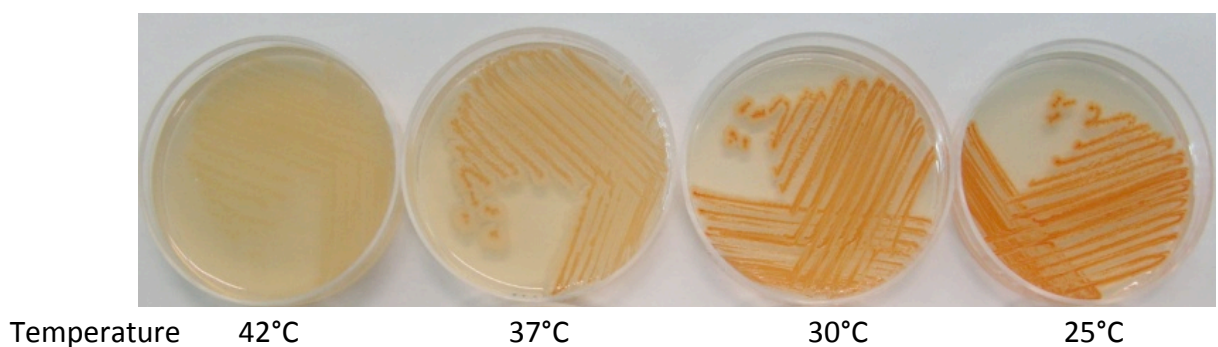


Fig 2.2: *Bacillus Pumilus* SF214 produce un pigmento sensibile alla temperatura. Infatti a 25°C produce elevate quantità di pigmento; tale quantità si riduce all'aumentare della temperatura. A 42°C le colonie appaiono bianche sulla piastra.

In questo capitolo è riportato come la produzione di pigmento in SF214 sia un processo altamente regolato, che si verifica durante la fase di crescita stazionaria solo in cellule non indirizzate verso il processo di sporulazione. La produzione del pigmento in SF214 appare allora come fenomeno bistabile alternativo alla sporulazione, ma che avviene parallelamente alla biosintesi della matrice ed è essenziale per la resistenza delle cellule a condizioni di stress ossidativo.

2.2 Materiali e Metodi

2.2.1 Condizioni di crescita dei batteri, induzione e purificazione delle spore

I bacilli sono stati coltivati sia in terreno ricco LB (per 1L: 10 g Bactotryptone, 5 g estratto di lievito, 10 g di NaCl, pH 7,0) sia in DSM (Difco-Sporulation-inducing medium) sia in terreno minimo S7 (50mM MOPS, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM fosfato di potassio pH 7,0, 2 mM MgCl_2 , 0,9 mM CaCl_2 , 50 μM MnCl_2 , 10 μM ZnCl_2 , 5 μM FeCl_3 , 2 mM tiamina idrocloruro, glutammato di sodio 20 mM, 1% di glucosio, 0,1 mg/ml fenilalanina, 0,1 mg/ml triptofano) in condizioni aerobiche. Per quanto riguarda la produzione di spore, le cellule sono state coltivate in terreno DSM in condizioni aerobiche per 48 ore (Cutting e Vander Horn, 1990). Le spore sono state raccolte per centrifugazione e purificate mediante ripetuti lavaggi con diverse soluzioni e trattate con lisozima, come già precedentemente riportato (Nicholson e Setlow,

1990). I ceppi di *B. subtilis* utilizzati come riferimento sono PY79 (wild type) (Youngman et al., 1984) e il ceppo isogenico BZ213 (*cotE* :: *cat*) (Zheng et al., 1988).

2.2.2 Estrazione e rivelazione del pigmento

Per l'estrazione del pigmento, le colture sono state centrifugate a 7000 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare è stato sospeso in un tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10% glicerolo) e sonicato a 4°C per 10 min (30 sec. ON e 30 sec. OFF). Il pellet è stato completamente rimosso per centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti a freddo (4°C). La concentrazione proteica degli estratti è stata determinata spettrofotometricamente e varie aliquote con identica concentrazione proteica sono state utilizzate per determinare lo spettro di assorbanza tra 300 e 550 nm, come già precedentemente riportato (Khaneja et al., 2010).

2.2.3 Test dell'acqua ossigenata(H_2O_2)

Cellule vegetative e spore sono stati diluiti ad una concentrazione di circa 10^8 CFU/ml in PBS, e 1ml della sospensione cellulare è stata trasferita in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml. H_2O_2 al 30% (Sigma) è stato aggiunto alle cellule in sospensione alla concentrazione di mM 30mM. Sospensioni di spore o cellule sono state incubate a temperatura ambiente con delicata

miscelazione continua. Dopo vari tempi di incubazione 100- μ l di campione sono stati prelevati e immediatamente diluiti, infine piastrati su piastre di LB agar e incubati per determinare il numero di colonie vitali.

2.2.4 Microscopia a fluorescenza e immunofluorescenza

Per l'autofluorescenza e la colorazione con DAPI sono stati centrifugate aliquote di 200 μ l di coltura cellulare (2 min a 6.000g) e il pellet cellulare è stato poi risospeso in 20 μ l di tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4). Solo per la colorazione con DAPI, il PBS conteneva in aggiunta 0,1 μ g/ml di *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride* (**DAPI**). Sei microlitri di ciascun campione sono stati posti su vetrini per microscopio e coperti con vetrini precedentemente trattati per 30 secondi con poli-L-lisina (Sigma). Campioni sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza **Olympus BX51** (*foto pag. successiva*) utilizzando un filtro *fluoresceina isotiocianato* (**FITC**) o **DAPI** per visualizzare la fluorescenza delle cellule. I tempi di acquisizione utilizzati sono stati 2000 ms per l'autofluorescenza e 100 ms per il DAPI e le immagini sono state acquisite ed elaborate utilizzando una fotocamera digitale Olympus DP70.

L'immunofluorescenza è stata eseguita essenzialmente come descritto da Azam et al (2000) (37), con alcune modifiche. I batteri sono stati fissati per 1 ora a temperatura ambiente in 80% metanolo, lavato, brevemente trattato con lisozima e fissato su vetrini trattati con poli-L-lisina per migliorare la

risoluzione micrografie. I vetrini sono stati asciugati all'aria e pretrattati con 5% (w/v) di latte liofilizzato sciolto in PBS, prima dell'incubazione overnight a 4°C con gli anticorpi primari. In particolare, sono stati utilizzati una diluizione 1:400 di anti-cotE (ottenuto in topo) e una diluizione 1:300 per anti-tasA (ottenuto in coniglio). Dopo dieci lavaggi, i campioni sono stati incubati con un anticorpo secondario specifico, coniugato con Tetrametil-rodamina, TRITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), diluito 1000 volte; l'incubazione è stata effettuata per circa 2 ore a temperatura ambiente in assenza di luce. Dopo ulteriori dieci lavaggi i vetrini sono stati coperti con una goccia (30 µl) del componente C (Slow Fade: Sonda molecolare S-2828) contenente 0,1 µg/ml di DAPI. Dopo 5 minuti il liquido in eccesso è stato aspirato e sono stati montati vetrini coprioggetti sui vetrini da microscopio aggiungendo una goccia di Componente A (Slow Fade: Sonda molecolare S-2828). Infine i vetrini sono stati analizzati con l'ausilio del microscopio.



Microscopio a fluorescenza **Olympus BX51**

2.3 Risultati

2.3.1 La produzione di pigmento è dipendente dalla fase di crescita, dalla temperatura e dalla disponibilità di nutrienti

La sintesi del pigmento idrosolubile prodotto da SF214 è un processo strettamente regolato in quanto dipende dalla fase di crescita, dalla temperatura e dal mezzo in cui cresce. La produzione di pigmento è risultata essere fortemente indotta, soltanto dopo circa dieci ore dall'ingresso delle cellule nella fase stazionaria di crescita a 37°C in terreno ricco (LB) (Fig. 2.3).

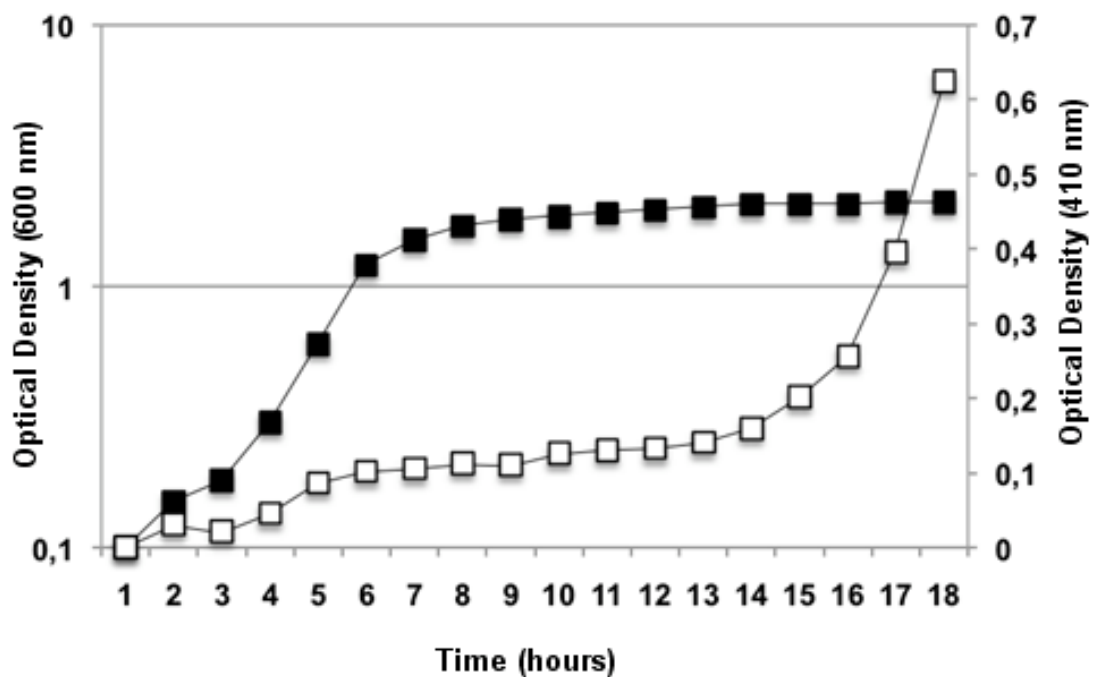


Fig 2.3: La curva di crescita SF214 a 37 ° C in ricco (LB) medio (simboli neri) è stata determinata seguendo straordinari la densità ottica della coltura a 600 nm. Produzione di pigmenti (simboli bianchi) è stata determinata misurando la densità ottica straordinari di 1 ml di cell-free supernatante di coltura a 410 nm.

Sebbene SF214 sia un batterio mesofilo e la sua temperatura di crescita ottimale è 37°C, la produzione massima del pigmento è stata osservata a 25°C (Tabella 2.1). Rispetto alle cellule coltivate a 25°C è stata osservata una sintesi del pigmento leggermente diminuita a 30°C, mentre è stata osservata una riduzione della produzione del pigmento di circa 2 volte quando il batterio cresce a 37 °C, e di circa 6 volte quando il batterio cresce a 42 °C (Tabella 2.1).

| Temp (°C) | Generation time ^a | Pigment ^b |
|-----------|------------------------------|----------------------|
| 4 | 0 | - |
| 25 | 95 | 1.822 |
| 30 | 80 | 1.412 |
| 37 | 60 | 0.745 |
| 42 | 65 | 0.288 |
| 50 | 0 | - |

Tabella 2.1: ^a minuti in terreno ricco LB; ^b valori in OD a 410 nm of 1 ml di supernatante di cellule cresciute per 24 ore in terreno ricco LB

Gli spettri di assorbanza tra 300 e 500 nm (Khaneja et al, 2010) di estratti cellulari di SF214 hanno dimostrato che le cellule cresciute a 25°C producono circa 4 più pigmento quando crescono in un terreno minimo (S7;. Simboli neri in Fig. 2.4) rispetto alla crescita in un terreno ricco (LB;. simboli grigi in Fig. 2.4), mentre in un terreno che induce la sporulazione (DSM;. simboli bianchi in Fig. 2.4) la sintesi del pigmento è quasi totalmente abolita.

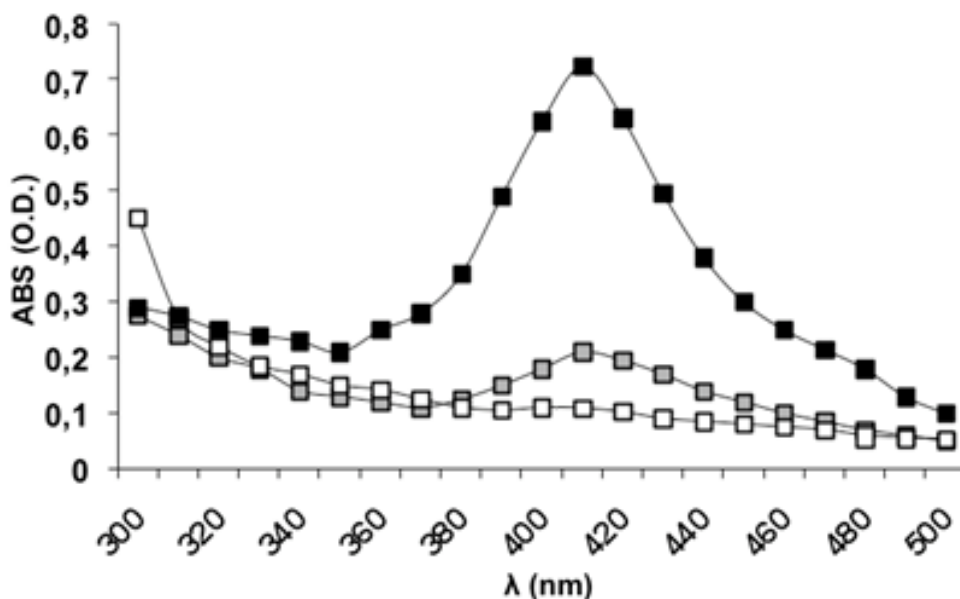


Fig 2.4: (B) lo spettro di assorbanza tra 300 e 500 nm di 360 µg di estratti cellulari di SF214 cresciuti a 25°C in terreno minimo (S7) (simbolo nero), terreno ricco (LB) (simbolo grigio) e terreno che induce la sporulazione (DSM).

2.3.2 Produzione eterogenea del pigmento

Studi precedenti hanno dimostrato che i carotenoidi prodotti dal lievito *Phaffia rhodozyma* (An et al., 2000) o dall'alga verde *Dunaliella salina* (Kleinegris et al., 2010) sono autofluorescenti e che tale proprietà può essere utilizzata per seguire la produzione dei carotenoidi mediante microscopia a fluorescenza. Abbiamo rinvenuto che anche il pigmento idrosolubile prodotto da *B.pumilus* SF214 è autofluorescente e che la fluorescenza non è localizzata in un punto specifico della cellula, ma diffusa nell'intero citoplasma cellulare. È stato interessante notare come nella coltura cellulare si potevano osservare sia cellule fluorescenti che cellule non fluorescenti. La figura 2.5 mostra un campo rappresentativo della popolazione cellulare osservato sia con

microscopia a contrasto di fase (a sinistra), sia con microscopia a fluorescenza, in seguito alla all'autofluorescenza del pigmento (centrale), sia dopo colorazione con DAPI (destra). I pannelli ingranditi della Fig. 2.5 mostrano chiaramente che solo una parte delle cellule colorate con DAPI erano autofluorescenti.

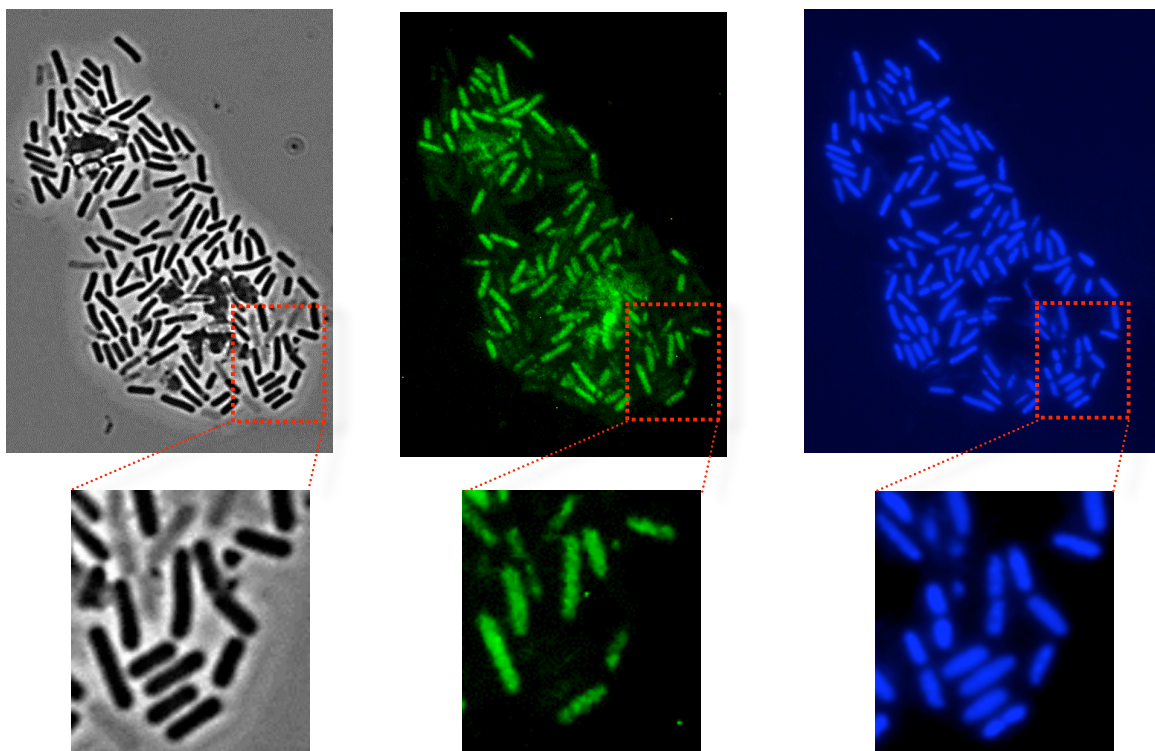


Fig 2.5: Lo stesso campo di microscopia osservato sia a contrasto di fase (a sinistra), autofluorescenza (al centro) e con colorazione DAPI (a destra). La stessa sezione di ogni pannello è stata ingrandita.

Due dati evidenti supportano la teoria che l'autofluorescenza osservata sia effettivamente dovuta alla presenza del pigmento idrosolubile:

- 1) I bacilli non pigmentati (compresi altri isolati di *B. pumilus*) non mostrano alcuna fluorescenza in identiche condizioni sperimentali (non mostrato);

- 2) il numero di cellule autofluorescenti varia coerentemente rispetto alle variazioni della produzione di pigmento osservate nelle differenti condizioni di crescita elencate nel paragrafo precedente (fase di crescita, disponibilità di nutrienti, temperatura)

Come mostrato in Fig. 2.6, il numero di cellule fluorescenti era maggiore per la colture in fase stazionaria, rispetto alla fase esponenziale (pannelli di sinistra), in cellule cresciute a 25°C rispetto a cellule cresciute a 37°C (pannelli centrali) e in cellule cresciute in terreno minimo (S7) rispetto al terreno ricco (LB) (pannelli a destra). Per ciascuna condizione considerata in Fig. 2.6, sono stati analizzati campi di microscopia differenti e per ciascuna condizione sono state contate 300 cellule (Fig. 2.6).

Questa analisi microscopica ha indicato ed evidenziato che l'aumentata produzione di pigmento osservata sulla base di caratteristiche quali la fase di crescita, la temperatura e il mezzo, non è dovuta ad una maggiore produzione di carotenoide, ma dal numero maggiore di cellule capaci di produrre il pigmento. Restringere il fenomeno di sintesi del pigmento ad una sottopopolazione di cellule, indica che in fase stazionaria tardiva SF214 è caratterizzato da una popolazione eterogenea di cellule e che la formazione di pigmento è un processo bistabile.

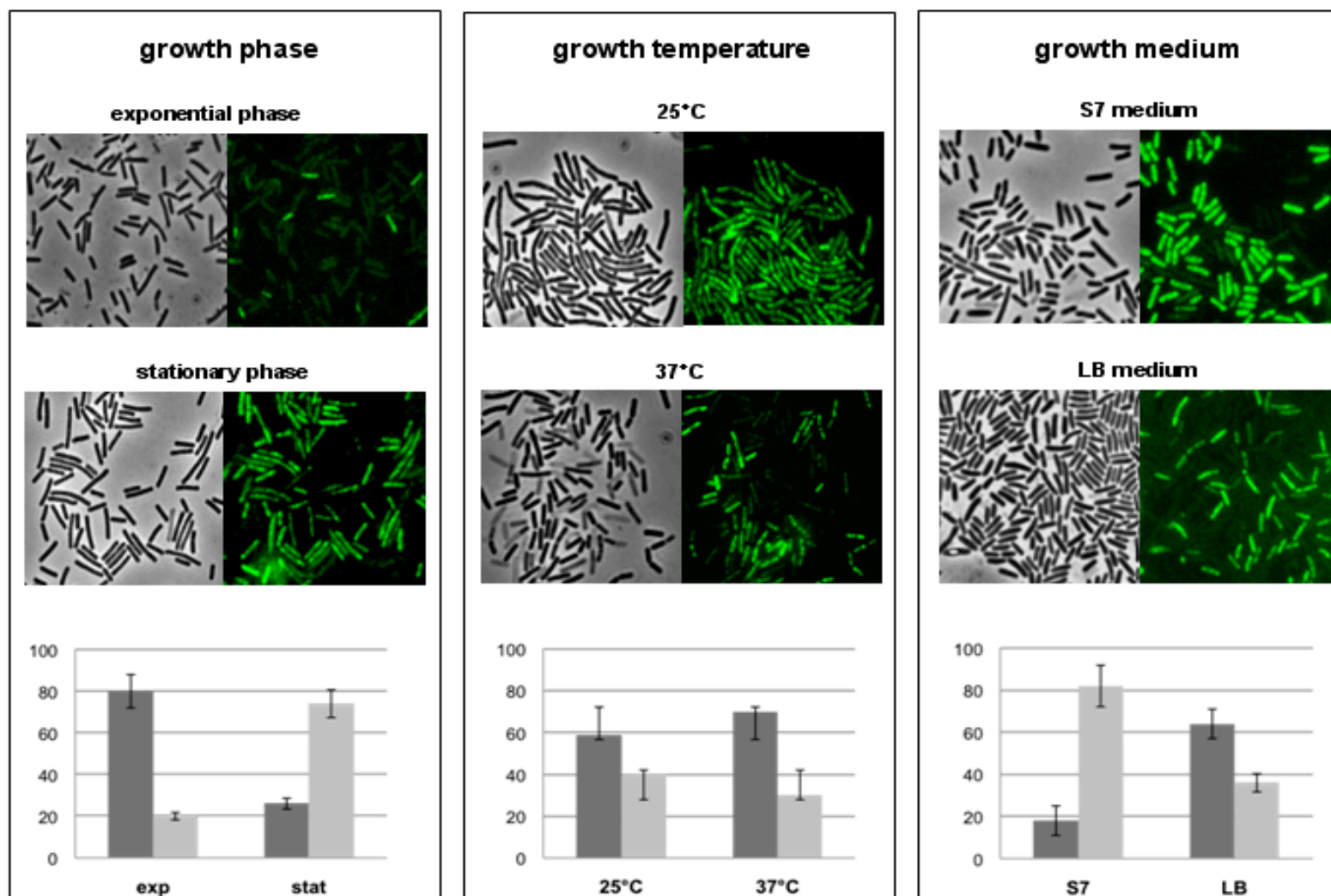


Fig 2.6: Campi di microscopia di cellule di *B. pumilus* SF214 coltivate in condizioni diverse e osservate per contrasto di fase e di autofluorescenza e confrontati per valutare la percentuale di cellule fluorescenti rispetto alle non fluorescenti. **Sinistra:** fase di crescita esponenziale vs stazionaria (in mezzo LB a 37 °C); pannello **centrale:** 25°C contro 37°C come temperatura di crescita (in terreno LB per 24 ore); **pannello destro:** terreno minimo (S7) vs terreno ricco (LB) di crescita (cellule stazionarie coltivate a 25°C). Per ogni pannello, in basso è riportato un grafico con la percentuale di cellule fluorescenti (barra grigia) vs non fluorescenti (barre nere). Per ogni condizione sono stati contati un totale di 300 cellule da 5 campi di microscopia differenti.

2.3.3 La produzione del pigmento avviene solo in cellule non sporulanti

Le spore libere così come le spore immature ancora contenute all'interno delle cellule madri sono note per la loro caratteristica intrinseca di autofluorescere (Pogliano et al, 1995). Tuttavia, in una cellula contenente una spora quasi matura la fluorescenza appare sempre limitata alla pre-spora e non diffusa nell'intero citoplasma della cellula madre. In Fig. 2.7 è mostrato un campo di microscopia rappresentante cellule sporulanti di SF214 osservati per contrasto di fase (a sinistra), autofluorescenza (al centro) e merge (a destra):

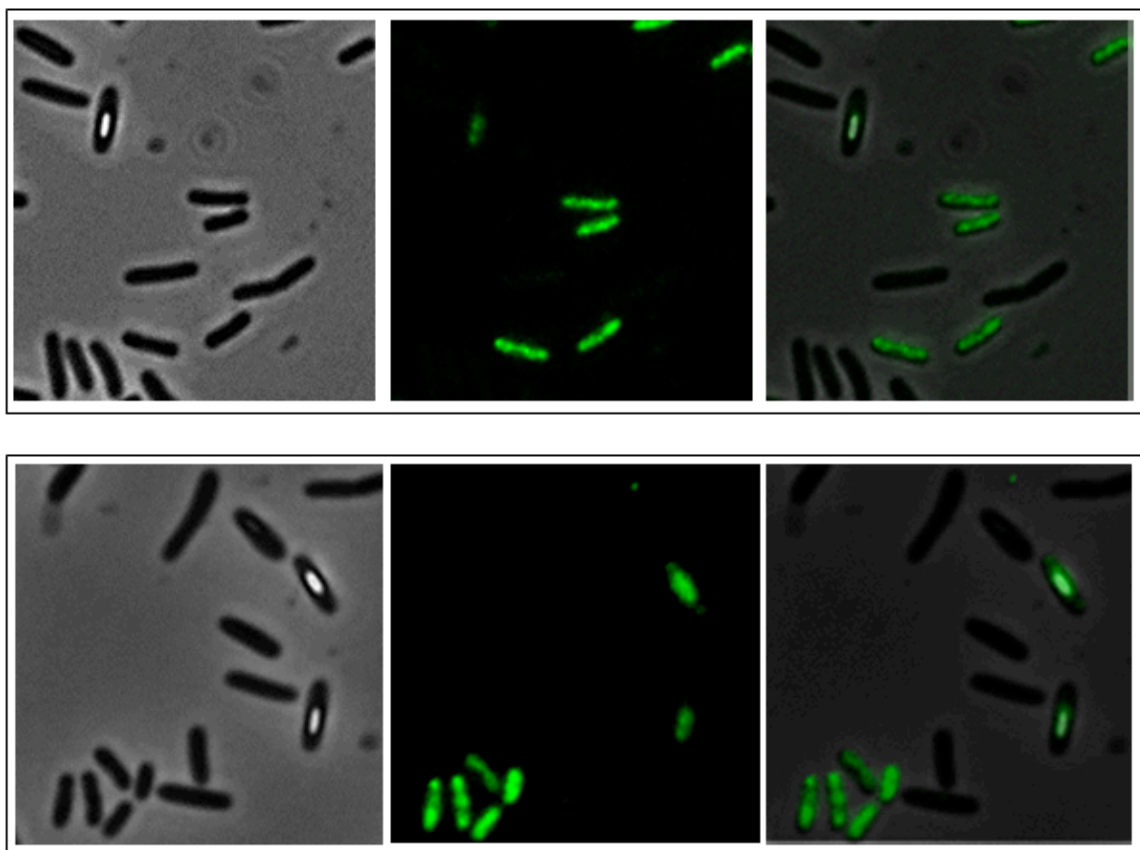


Fig 2.7: Lo stesso campo di microscopia osservato sia a contrasto di fase (a sinistra), che con autofluorescenza (al centro). Il pannello di destra riporta la sovrapposizione del contrasto di fase con le immagini di autofluorescenza. Le cellule sono state coltivate in terreno ricco (LB) per 15 ore.

Da tale immagine si può notare che mentre solo alcune cellule emettono fluorescenza diffusa nel citoplasma (vedi paragrafo precedente), la fluorescenza associata ad alle cellule contenenti pre-spore è chiaramente limitata alla spora prematura. Questa osservazione, in associazione all'esperimento riportati in Fig. 2.4 che indica assenza di pigmento prodotto quando le cellule sono coltivate in un terreno che induce la sporulazione (DSM), suggerisce che la produzione di pigmento in *B. pumilus* SF214 è mutuamente esclusiva rispetto alla formazione di spore.

Per affrontare al meglio questo punto abbiamo analizzato le cellule di *B.pumilus* SF214 attraverso l'autofluorescenza indotta dal pigmento (verde) e attraverso un'immunofluorescenza con anticorpo primario anti-cotE e un anticorpo secondario fluorescente (rosso). **CotE** è una proteina di rivestimento delle spore (Zheng et al., 1988), prodotta precocemente durante la sporulazione, nota per localizzare sulla superficie delle spore (Pogliano et al., 1995). Per la nostra analisi è stato usato un anticorpo specifico nei confronti di cotE di *B.subtilis* (Isticato et al., 2010). In un esperimento preliminare è stato dimostrato che questo anticorpo è in grado di riconoscere una proteina di *B.pumilus* SF214 corrispondente alle dimensioni di Cote di *B. subtilis* (Fig 2.8). In Fig. 2.9 sono riportati dei campi rappresentativi dell'analisi effettuata di microscopia a fluorescenza e immunofluorescenza di cellule di SF214 cresciute in LB a 37°C fino alla fase stazionaria precoce. In questa analisi abbiamo

osservato che le cellule riconosciute dalla anti-CotE antibody erano tutte **non auto-fluorescenti**.

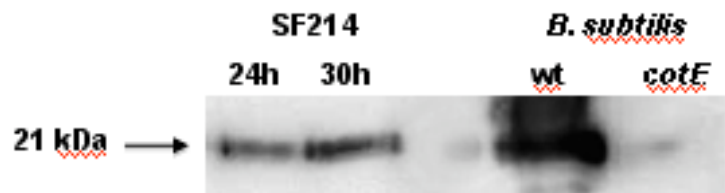


Fig 2.8: analisi di Western Blot di proteine di rivestimento delle spore di SF214. Spore purificate sono stati estratte mediante trattamento SDS-DTT come precedentemente riportato (Nicholson e Setlow, 1990), frazionati su SDS-PAGE al 12% e trasferite su una membrana di PVDF. La membrana è stata fatta reagire con l'anticorpo generato contro la proteina CotE di *B. subtilis* (Isticato et al., 2010), poi fatto reagire contro un anticorpo secondario coniugato e visualizzato mediante il metodo ECL. Proteine di rivestimento di tipo selvatico e un mutante isogenico privo della proteina CotE di *B. subtilis* sono stati utilizzati rispettivamente come controllo positivo e negativo.

Nei pannelli uniti di Fig. 2.9 non abbiamo mai osservato cellule gialle, che sarebbe stato indicativo di cellule che producono il pigmento (segnale verde) e la proteina CotE spora-specifica (segnale rosso). Pertanto, sulla base di esperimenti raffigurati in Fig. 2.7 e Fig. 2.9 possiamo concludere che la sintesi del pigmento e la sporulazione sono percorsi di sviluppo alternativi e si verificano in diverse sottopopolazioni cellulari.

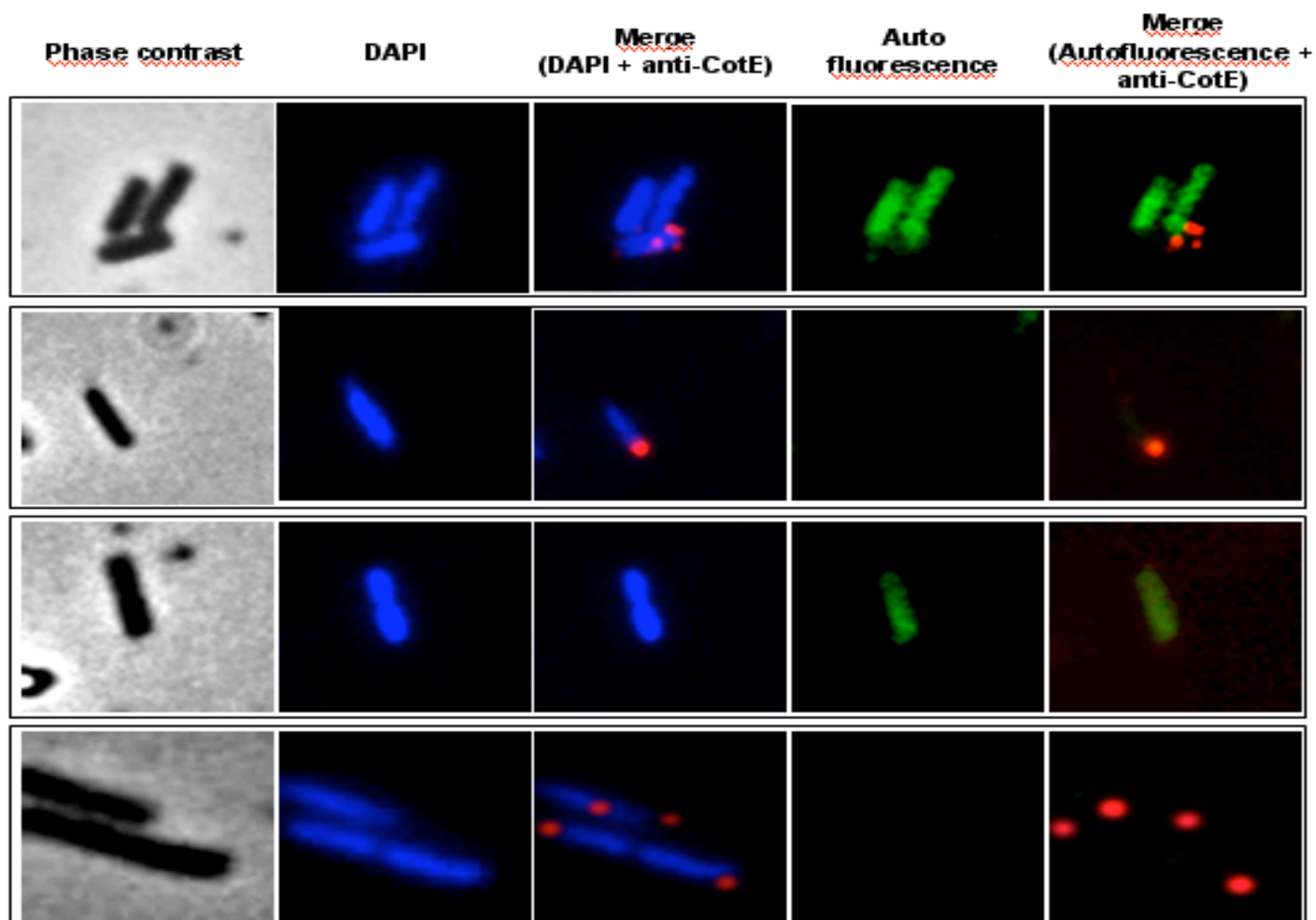


Fig 2.9: Analisi al microscopio di cellule provenienti da diversi campi osservati a contrasto di fase, colorazione DAPI, immunofluorescenza con anticorpo anti-cotE primario e anticorpo secondario Texas Red coniugato sovrapposto sia al segnale DAPI, sia al segnale dell'autofluorescenza.

2.3.4 La produzione della matrice avviene in una sottopopolazione di cellule pigmentate.

In *B. subtilis* il processo di sporulazione e la formazione della matrice sono programmi di sviluppo alternativi (Lopez et al., 2009b). Poiché anche SF214 è in grado di formare una matrice (Khaneja et al., 2010) abbiamo deciso di verificare se anche in questo batterio la formazione di matrice e la sporulazione fossero processi alternativi e se la sintesi della matrice e la produzione di pigmento potessero verificarsi nelle stesse cellule. A tale scopo abbiamo analizzato SF214 tramite l'autofluorescenza dovuta alla presenza del pigmento nelle (verde) e tramite immunofluorescenza con l'ausilio dell'anticorpo primario anti-TasA e di un anticorpo secondario fluorescente (rosso). TasA è un componente proteico del biofilm di *B. subtilis* (Branda et al, 2006.), codificato dal terzo gene dell'operone *yqxM-sipW-tasA* (Serrano et al, 1999;.. Chu et al, 2006). Per la nostra analisi abbiamo utilizzato anticorpi che riconoscono specificamente la proteina tasA di *B. subtilis*. Un esperimento preliminare effettuato ci ha permesso di dimostrare che da spore di ceppo SF214 può essere estratta una proteina omologa a TasA di *B. subtilis* e che questa proteina viene riconosciuta dal anticorpo anti-tasA (Fig 2.10). L'omologia con la proteina di SF214 inizia nella posizione 24 di tasA, che corrisponde al primo residuo aminoacido della forma matura dei TasA dopo la

maturazione proteolitica di pre-tasA (Stover e driks, 1999;. Serrano et al, 1999)

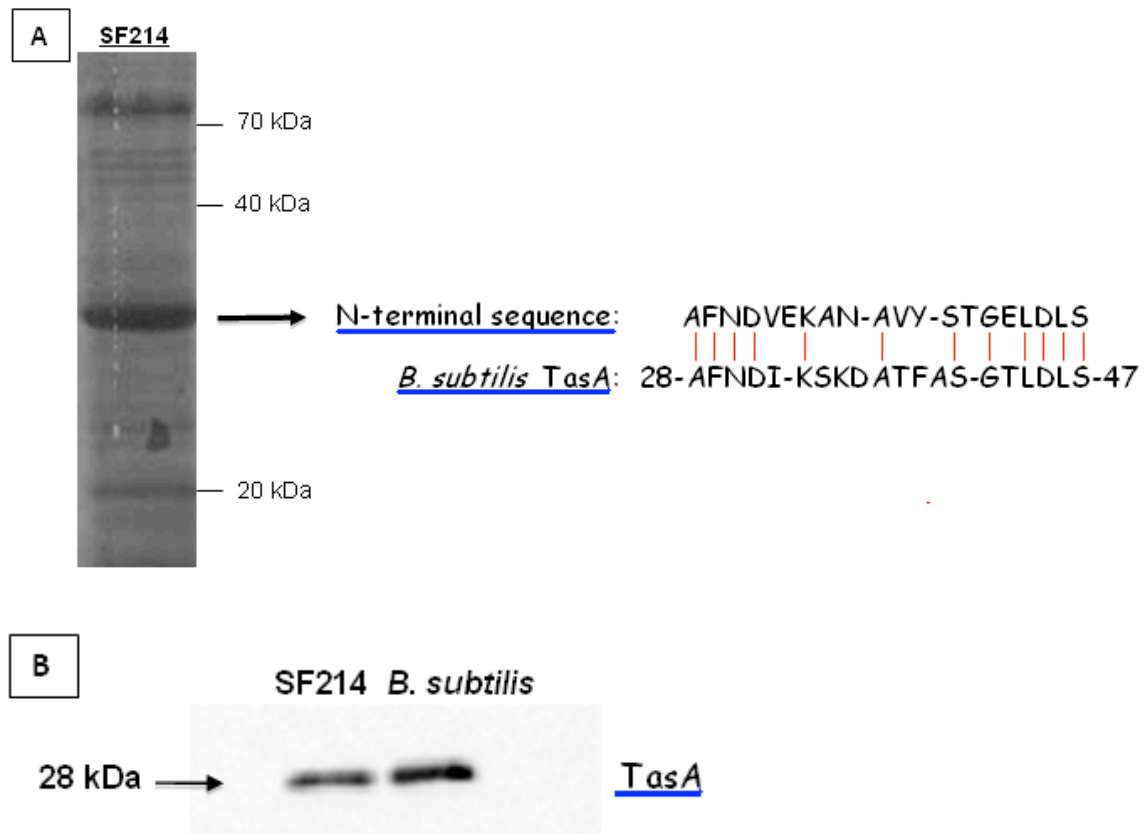


Fig 2.10: (A) Una proteina abbondante estratta da spore di SF214 e di dimensioni corrispondenti a TasA di *B.subtilis* (28 kDa) è stata trasferita su una membrana di PVDF e sottoposta alla reazione di degradazione di Edman, determinando la sequenza degli ultimi 20 residui aminoacidici. Un'analisi di Blast della proteina di SF214 ci ha permesso di identificarla come omologa alla proteina di TasA di *B. subtilis* con l'omologia a partire dalla posizione 24 della proteina *B.subtilis*. (B) Analisi di Western blot di proteine di rivestimento delle spore di SF214. Proteine Sporiali sono state estratte con SDS-DTT come già precedentemente riportato (Nicholson e Setlow, 1990), frazionati su 12% SDS-PAGE e trasferite su una membrana di PVDF. La membrana è stata fatta reagire con l'anticorpo generato contro la proteina TasA di *B. subtilis*, poi fatto reagire contro anticorpo secondario coniugato e visualizzati mediante il metodo ECL. Proteine di rivestimento di un ceppo di tipo selvatico (PY79) di *B. subtilis* sono stati utilizzati come controllo.

In Fig.2.11 sono raffigurati campi rappresentativi di microscopia di analisi a fluorescenza e immunofluorescenza di cellule di *B.pumilus* SF214 cresciute in terreno minima (S7) a 25°C fino alla fase stazionaria precoce. Questa analisi ha mostrato che:

- 1) Cellule che non erano autofluorescenti e quindi indirizzate verso la sporulazione (indicate dalle frecce bianche in Fig. 2.11-A) non sono state riconosciute dal anticorpo anti-TasA;
- 2) solo alcune cellule autofluorescenti sono stati riconosciuti da anticorpi anti-TasA (cellule che appaiono gialle al merge in fig. 2.11).

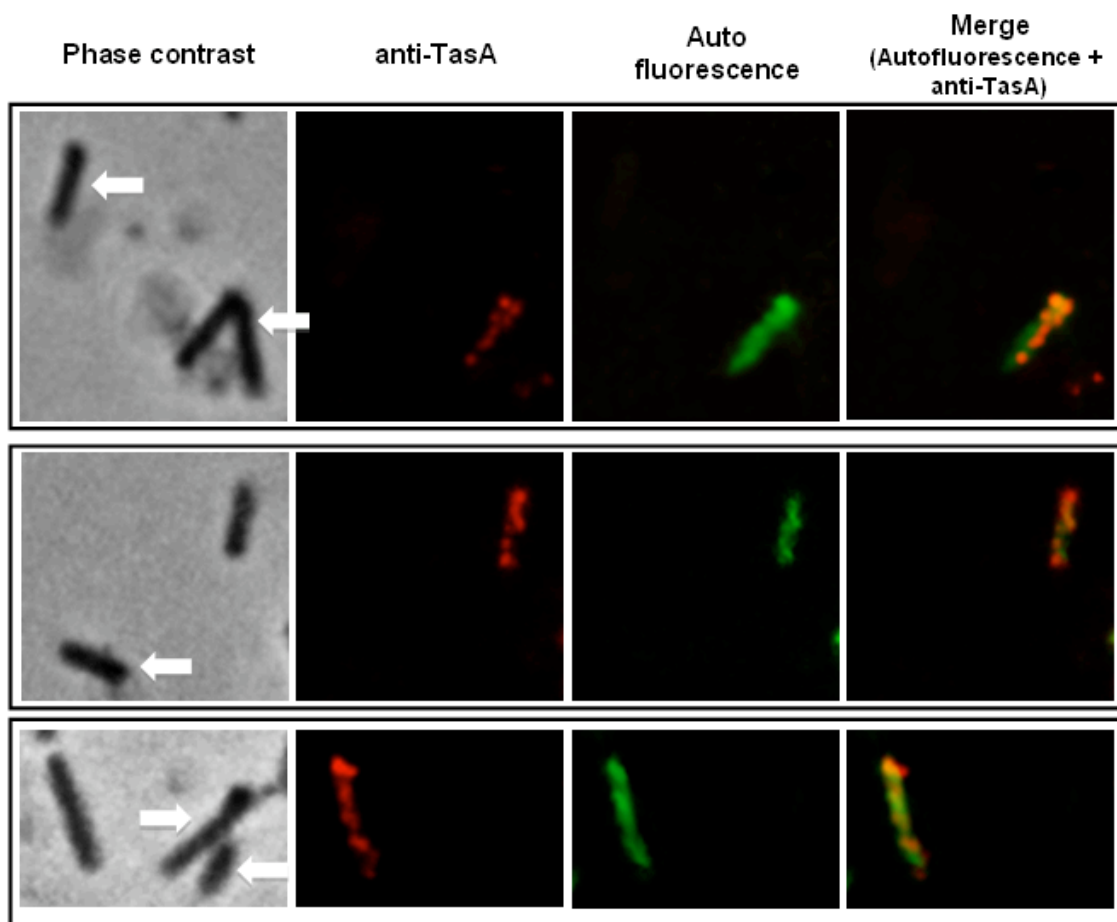


Fig 2.11 Pannello A: Analisi al microscopio di cellule provenienti dall'osservazione di diversi campi a contrasto di fase, con l'immunofluorescenza con anticorpo primario anti-TasA e anticorpo secondario coniugato con Texas Red, con autofluorescenza e con merge tra immunofluorescenza e autofluorescenza.

Esempi di cellule che non sono autofluorescenti e che non vengono riconosciuti neanche dall'anticorpo anti-tasA (sono indicati da frecce).

Il Pannello B della fig. 2.11 (vedi sotto) mostra alcuni esempi di cellule autofluorescenti che non sono riconosciuti da anticorpi anti-TasA. Questi

risultati indicano che anche in *B. pumilus* SF214, così come avviene *B. subtilis*, il processo di sporulazione e la formazione della matrice sono processi alternative e che la sintesi della matrice si verifica solo in una sottopopolazione di cellule pigmentate.

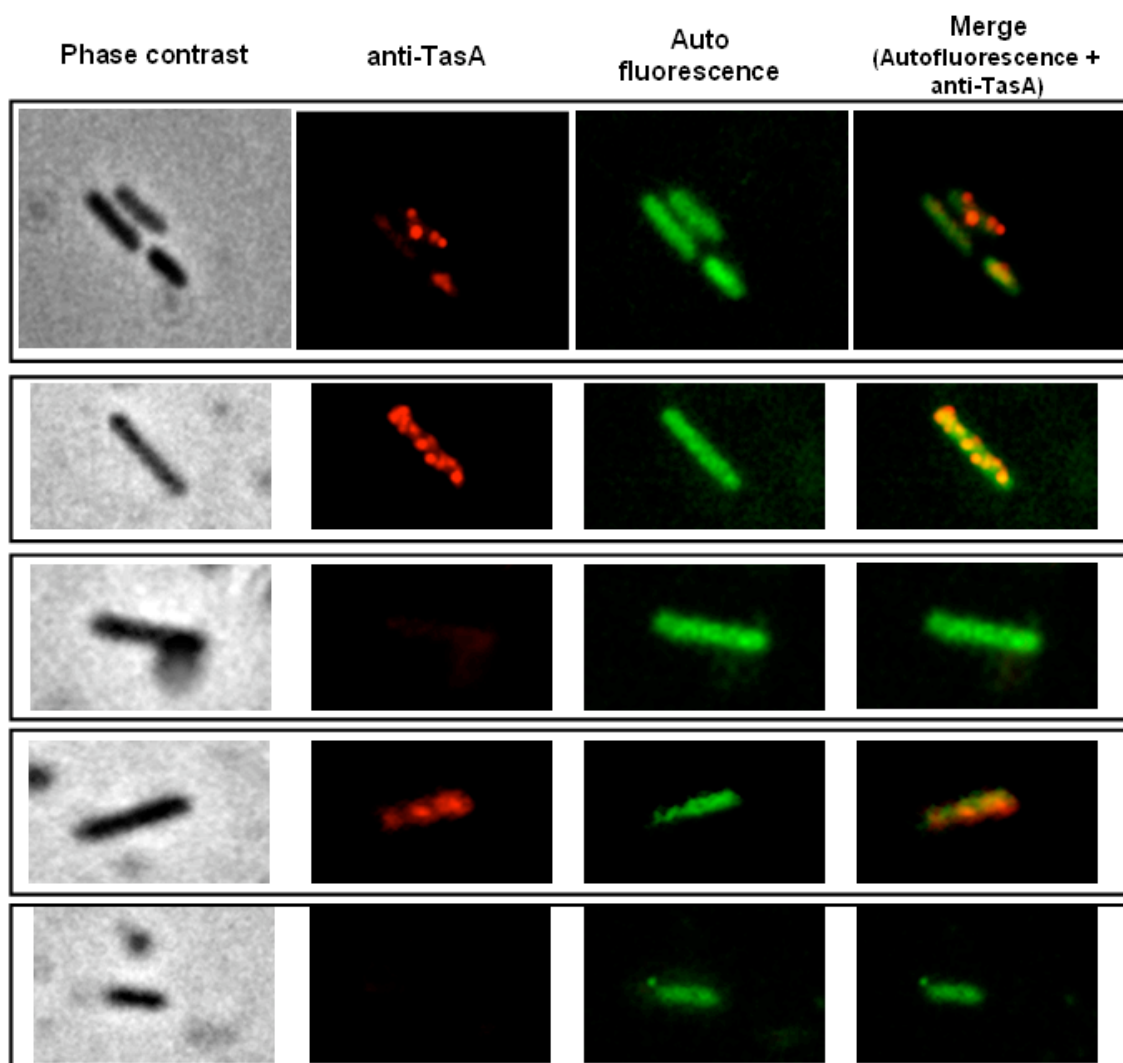


Fig 2.11 Pannello B: Analisi al microscopio di cellule provenienti dall'osservazione di diversi campi a contrasto di fase, con l'immunofluorescenza con anticorpo primario anti-TasA e anticorpo secondario coniugato con Texas Red, con autofluorescenza e con merge tra immunofluorescenza e autofluorescenza. Esempi di cellule fluorescenti, con alcune riconosciute dall'anticorpo anti-tasA (giallo nel merge) e alcune non riconosciute.

2.3.5 Il pigmento di SF214 conferisce resistenza all' H_2O_2

Ai pigmenti prodotti dagli organismi non-fotosintetici sono stati associati diverse funzioni, tra cui quelle di conferire alle cellule dalle radiazioni UV e delle specie reattive dell'ossigeno (Khaneja et al, 2010;. Manzo et al, 2011; Steiger et al, 2012). Per analizzare il ruolo del pigmento in *B.pumilus* SF214 abbiamo isolato un mutante non pigmentato dopo mutagenesi con nitrosoguanidina (NTG) (Cutting S. e Vander Horn PB., 1990) (Fig 2.13).

Survival of SF214 cells after NTG treatment

| | Time of incubation with 10 μ g NTG (min) | | | |
|-----|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 |
| CFU | 1.1×10^8 | 9.8×10^7 | 2.9×10^7 | 5.7×10^6 |
| (%) | (100) | (89.1) | (26.4) | (5.2) |

Fig 2.12: Sopravvivenza di SF214 dopo trattamento con 10 μ g di NTG a vari tempi. Cellule in fase esponenziali sono state trattate con NTG, lavate due volte, diluite, piastrate su LB ed incubate a 37°C per 36 ore.

A tale scopo cellule giunte a metà della fase esponenziali sono state incubate con 10 μ g di NTG ed è stata valutata la percentuale di sopravvivenza a tempi diversi, attraverso la conta di CFU (Fig 2.12). Per minimizzare la possibilità di avere mutanti portatori di mutazioni multiple, abbiamo analizzato solo cellule esposte a NTG per il minor tempo possibile. Le cellule trattate con NTG sono state poi diluite, piastrate e selezionate per il tipo di pigmentazione dopo 36 ore di incubazione a 25°C. Diversi tentativi di trasformare SF214 con DNA sia plasmidico che cromo somale sono costantemente falliti, precludendo, finora, la

possibilità di spostare la mutazione in uno sfondo non mutagenizzato. Pertanto, non si può escludere apriori la possibilità che più di una mutazione sia presente nel genoma del mutante non pigmentato.



Fig 2.13: *B.pumilus* SF214 wild type e mutante non pigmentato (Mut) su una piastra di LB tenuta a 25°C per 48 ore.

Tuttavia, l'analisi degli estratti acquosi di SF214 ha mostrato che il mutante non

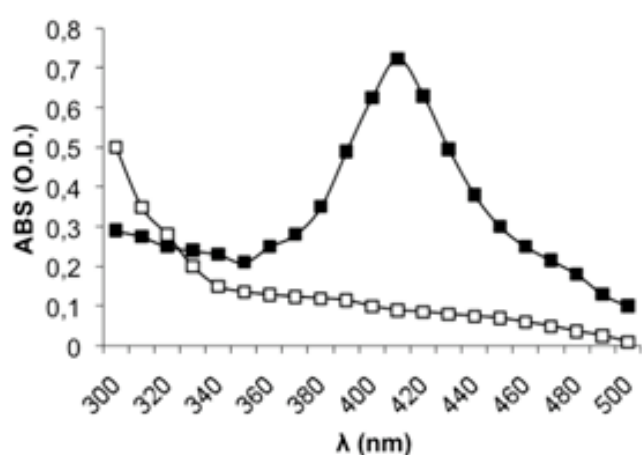


Fig 2.14: Spettro di assorbanza tra 300 e 500 nm di 360 µg di estratti cellulari di SF214 wild type (simboli neri) e mutante non pigmentato (simboli bianchi). Cellule di entrambi i ceppi sono stati coltivati a 25°C per 24 ore.

produce alcuna molecola capace di assorbire a 410 nm (Fig 2.14) e, allo stesso tempo, un'analisi tramite microscopio a fluorescenza ha mostrato l'assenza quasi totale di cellule fluorescenti in una cultura in fase stazionaria del mutante non pigmentato(Fig 2.15).

SF214 e il suo derivato non pigmentato (Mut) sono stati utilizzati per analizzare la risposta cellulare al perossido di idrogeno.

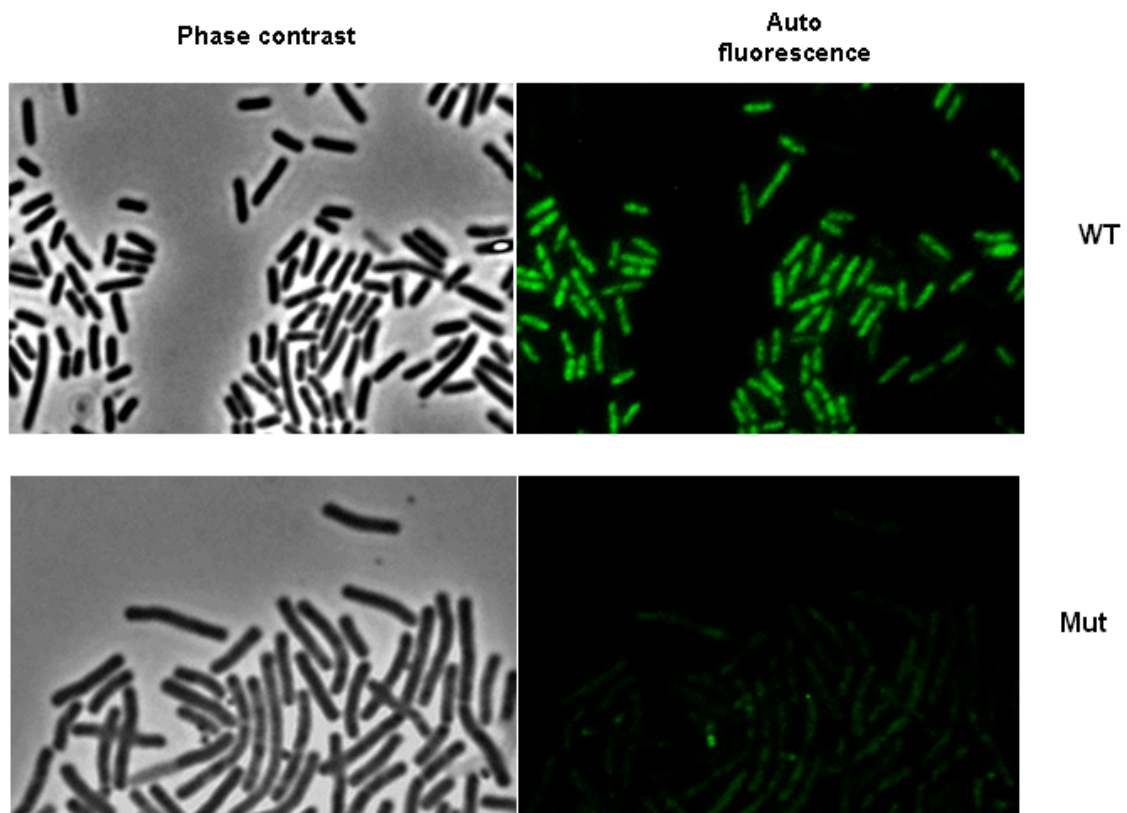


Fig 2.15: Analisi di microscopia di SF214 e del suo mutante non pigmentato (Mut). Per ogni ceppo è mostrato lo stesso campo sia con il contrasto di fase (a sinistra) e sia in autofluorescenza (a destra).

Le cellule dei due ceppi sono stati coltivati a 25°C in terreno minima (S7) liquido e sono state raccolte 10 ore dopo l'entrata in fase stazionaria di crescita. Le cellule sono state poi incubate con 30 nM di perossido di idrogeno e analizzati per la vitalità dopo vari tempi di incubazione. Mentre le cellule di tipo selvatico erano vitali dopo esposizione a perossido di idrogeno fino 30 minuti e mostravano una ridotta vitalità solo dopo 45, 60 e 90 minuti di trattamento, il mutante non pigmentato mostrava una netta diminuzione della

vitalità a tutti i tempi di incubazione (Fig. 2.16). In un esperimento parallelo spore di entrambi i ceppi sono risultate completamente resistenti al trattamento con perossido di idrogeno in tutti i punti temporali testati (Fig. 2.16). I risultati mostrati in Fig. 2.16 confermano che il pigmento ha un ruolo importante nella risposta allo stress ossidativo delle cellule vegetative. Le spore non contengono il pigmento, ma sono totalmente resistenti al perossido di idrogeno a causa di altri meccanismi indipendenti dalla presenza del pigmento, (Setlow, 2006. Bosak et al 2008).

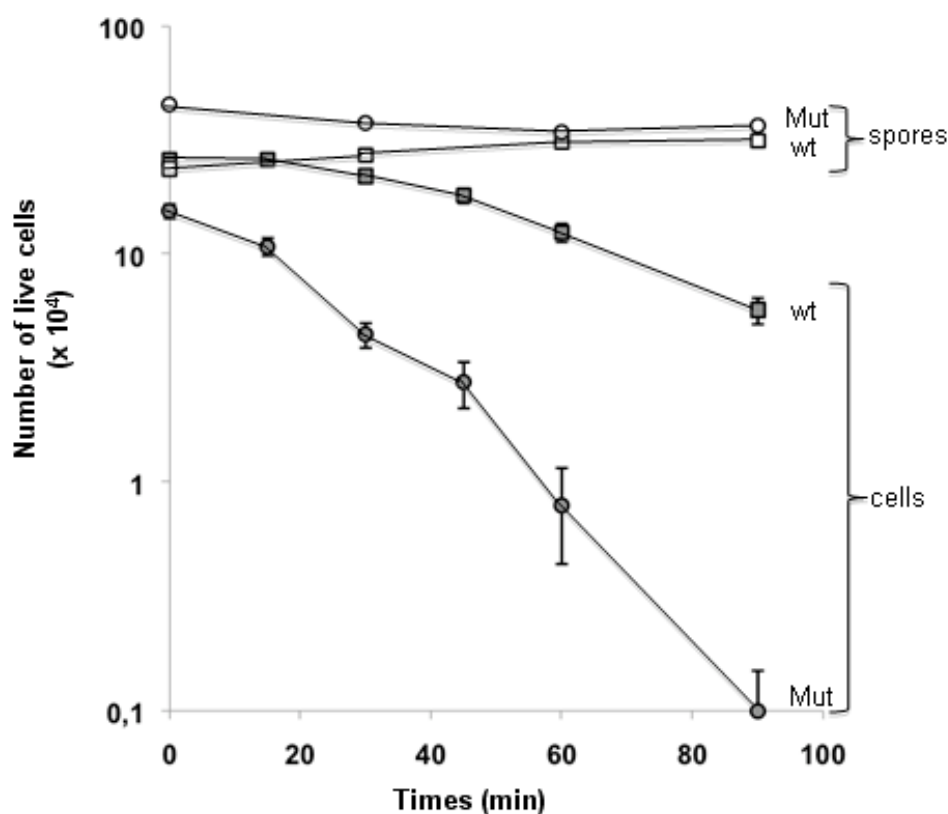


Fig 2.16: sopravvivenza cellulare e delle spore dopo trattamento con H₂O₂ (30 mM) a vari tempi. Per ciascun trattamento il numero in CFU di cellule (simboli grigi) e spore (simboli bianchi) del ceppo SF214 (quadrati) e del mutante (cerchi) è stato ottenuto mediante piastra tura su LB e incubazione per 36 ore a 27°C

2.4 Discussione

Il risultato principale di questo lavoro è l'osservazione che la produzione di pigmento in SF214, un isolato marino di *B. pumilus*, è un fenomeno bistabile alternativo alla sporulazione. Cellule di SF214 in fase stazionaria di crescita costituiscono una popolazione eterogenea in grado di seguire diversi destini di sviluppo. Alcune cellule avviano il programma di sporulazione, mentre altre producono il pigmento. Solo una sottopopolazione di cellule pigmentate produce anche matrice extra-cellulare. Questo ricorda la situazione trovata nelle cellule non pigmentate di *B. subtilis*. Studi eseguiti utilizzando *B. subtilis*, l'organismo modello dei batteri sporigeni, hanno dimostrato che in popolazioni di cellule disperse, la formazione di spore, la produzione di matrice, la competenza di acquisire DNA esogeno e la produzione di proteasi extracellulari sono tutti processi bistabili (Chai et al., 2008; Chai et al, 2010;.. Chai et al, 2011). La formazione di spore o della matrice appaiono come percorsi di sviluppo alternativi con alcune cellule che producono biofilm e altre indirizzate verso il programma irreversibile della formazione di spore (Vlamakis et al, 2008; Chai et al, 2010;.. Chai et al, 2011). In *B. subtilis* in aggiunta a questi due destini cellulari ci sono altre alternative possibili: all'interno di un biofilm, solo una sottopopolazione di cellule di *B. subtilis* producono surfattina ma, mentre i produttori di surfattina non rispondono alla surfattina da essi stessi prodotta, le altre cellule rispondono e diventano produttori di matrice. Infatti non sono mai

state osservate singole cellule di *B. subtilis* in grado di esprimere contemporaneamente geni necessari sia per la sintesi della surfattina sia per la sintesi della matrice (Lopez et al, 2009b). Queste due sottopopolazioni non comprendono l'intera popolazione cellulare e le cellule che non differenziano né come produttori di surfattina, né come produttori di matrice, probabilmente danno origine ad altri tipi di cellule notoriamente presenti in popolazioni di *B. subtilis* (Veening et al, 2008). In questo quadro ogni destino differenziazione pone le basi per un susseguente tipo di cellula. Ad esempio, all'interno del biofilm le cellule produttrici di matrice sono inizialmente predominanti per poi differenziarsi e diventare spore (Vlamakis et al. 2008). Analogamente, proponiamo che cellule di *B. pumilus* SF214 in fase stazionaria rappresentano una popolazione eterogenea in grado di seguire diversi destini di sviluppo. Alcune cellule entrare nel ciclo irreversibile della sporulazione formano spore altamente resistenti alle condizioni non favorevoli per il batterio, mentre altre cellule seguono una diversa strategia di sopravvivenza producendo un pigmento in grado di proteggere la cellula da condizioni di stress ossidativo. La diversificazione cellulare e la capacità di sviluppare strategie di sopravvivenza diverse in *B. pumilus* SF214 può quindi essere vista come una strategia di ripartizione dei rischi (o bet hedging). Tali commutazioni stocastiche tra gli stati fenotipiche sono state trovate in organismi che vanno dai batteri agli esseri umani e sono considerate tra le prime soluzioni evolutive di adattamento e di persistenza facilitata in ambienti fluttuanti (Beaumont et al., 2009).

Un ulteriore risultato di questo lavoro nasce dalla constatazione che la formazione di pigmento è un processo altamente regolato. Le condizioni di crescita influenzano la sintesi del pigmento probabilmente regolando il numero di cellule che diventano in grado di sintetizzarlo. Questa conclusione è supportata dal numero di cellule fluorescenti (rispetto a quelle non fluorescenti) osservate in diversi campi di microscopia (Fig. 2.6). Sebbene la nostra analisi non ci permette di valutare la quantità di pigmento sintetizzato in una singola cellula nelle varie condizioni, mostra chiaramente che viene esercitata un'azione regolatoria che induce la cellula a iniziare il processo di sporulazione o la sintesi del pigmento.

Sono stati effettuati diversi tentativi per cercare di manipolare geneticamente il ceppo SF214 di *B. pumilus*, tentativi che sono stati fino ad ora effettuati senza successo. L'impossibilità di manipolare SF214 ha finora compromesso una più approfondita analisi molecolare dei destini diversi di sviluppo della SF214 e delle proteine regolatrici coinvolte. Un compito futuro sarà di verificare se il principale regolatore Spo0A, noto per controllare la formazione della matrice e la sporulazione, nonché altri destini della cellula di *B. subtilis*, come ComX, Sini/R, sono coinvolti nello sviluppo e nella produzione del pigmento in *B. pumilus*.

2.5 Bibliografia

- Aguilar C, Vlamakis H, Guzman A, Losick R, Kolter R (2010) KinD Is a Checkpoint Protein Linking Spore Formation to Extracellular-Matrix Production in *Bacillus subtilis* Biofilms. *mBio* 1:1 e00035-10.
- An G-H, Suh O-S, Kwon H-C, Kim K, Johnson EA (2000) Quantification of carotenoids in cells of *Phaffia rhodozyma* by autofluorescence. *Biotechnol Letters* 22:1031–1034.
- Beaumont HJE, Gallie J, Kost C, Ferguson GC, Rainey PB (2009) Experimental evolution of bet hedging. *Nature* 462:90-94.
- Bosak T, Losick RM, Pearson A (2008) A polycyclic terpenoid that alleviates oxidative stress *Proc. Natl Acad Sci USA* 105:6725–6729.
- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 59: 1229–1238
- Chai Y, Chu F, Kolter R, Losick R (2008) Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 67:254-263.
- Chai Y, Norman T, Kolter R, Losick R (2010) An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 24: 754–765
- Chai Y, Norman T, Kolter R, Losick R (2011) Evidence that metabolism and chromosome copy number control mutually exclusive cell fates in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 30:1402-1413.
- Chu F, Kearns DB, Branda SS, Kolter R, Losick R (2006) Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 59: 1216–1228.
- Cremades O, Ponce E, Corpas R, Gutierrez JF, Jover M, Alvarez-Ossorio MC, Parrado J, Bautista J (2001) Processing of crawfish (*Procambarus clarkii*) for the preparation of carotenoproteins and chitin. *J Agric Food Chem* 49:5468–5472.

- Cutting SM, Hong HA, Baccigalupi L, Ricca E (2009) Oral Vaccine Delivery by Recombinant Spore Probiotics. *Int Rev Immunol* 28:487–505.
- Cutting, S. and P. B. Vander Horn. (1990) Genetic analysis *In*: C. Harwood and S. Cutting (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, UK. pp. 27-74).
- Duc LH, Fraser P, Cutting SM (2006) Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *FEMS Microbiol Lett* 255:215–224.
- Fujita M, Losick R (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev* 19: 2236–2244
- Henriques AO, Moran CP Jr. (2007) Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers *Annu. Rev. Microbiol.* 61:555–588.
- Hong HA, To E, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM (2009) Defining the natural habitat of *Bacillus* sporeformers. *Res Microbiol.* 160:375-379.
- Khaneja R, Perez-Fons L, Fakhry S, Baccigalupi L, Steiger S, To E, Sandmann G, Dong TC, Ricca E, Fraser PD, Cutting SM (2010) Carotenoids found in *Bacillus*. *J. Appl. Microbiol* 108:1889–1902.
- Kleinegris D, van Es MA, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH. 2010. Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol* 22:645–649
- Lopez D, Vlamakis H, Kolter R (2009a) Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* 33:152–163
- Lopez D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2009b) Paracrine signaling in a bacterium. *Genes&Develop* 23:1631-1638.
- Manzo N, D'Apuzzo E, Coutinho PM, Cutting SM, Henrissat B, Ricca E. (2011) Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation. *BMC Microbiol.* 11:198.

- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* 11:33-44.
- Nicholson WJ, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:548-572.
- Nicholson WL, Setlow P (1990) Sporulation, germination and outgrowth. In C. Harwood and S. Cutting (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, UK. pp. 391-450.
- Pogliano K, Harry E, Losick R (1995) Visualization of the subcellular location of sporulation proteins in *Bacillus subtilis* using immunofluorescence microscopy. *Mol Microbiol.* 18:459-470.
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R (2010) Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2230–2234.
- Serrano, M, Zilhao R, Ricca E, Ozin AJ, Moran CP, Henriques A (1999) A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function *J. Bacteriol* 181:3632–3643.
- Setlow P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol.* 101:514-525.
- Steiger S, Perez-Fons L, Fraser PD, Sandmann G. (2012) Biosynthesis of a novel C30 carotenoid in *Bacillus firmus* isolates. *J. Appl. Microbiol* 110:888-895.
- Stover AG, Driks A (1999) Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J Bacteriol.* 181:1664-1672.
- Veening JW, Smits WK, Kuipers OP. (2008) Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 62:193-210.
- Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R (2008) Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 22:945–953.

- Youngman P, Perkins JB, Losick R (1984) A novel method for the rapid cloning in *Escherichia coli* of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA adjacent to Tn917 insertion. *Mol. Gen. Genet.* 195:424-433.
- Zheng L, Donovan WP, Fitz-James PC, Losick R (1988) Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes&Develop.* 2:1047-1054.

Allegato 2

(accettato per la pubblicazione)

X-Sieve: CMU Sieve 2.3
X-Sieve: CMU Sieve 2.3
Sender: em.pone.0.31cf10.c10f0780@editorialmanager.com
From: "PLOS ONE"
<plosone@plos.org>
To: "Ezio Ricca"
<ericca@unina.it>
Date: 17 Mar 2013 06:02:15 -0400
Subject: PLOS ONE Decision: Accept [PONE-D-13-04862R1]

PONE-D-13-04862R1
Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *Bacillus pumilus* SF214
PLOS ONE

Dear Ezio,

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE.

Your manuscript will now be passed on to our Production staff, who will check your files for correct formatting and completeness. After this review, they may return your manuscript to you so that you can make necessary alterations and upload a final version.

Best

Riccardo

Before uploading, you should check the PDF of your manuscript very closely. THERE IS NO AUTHOR PROOFING. You should therefore consider the corrected files you upload now as equivalent to a production proof. The text you supply at this point will be faithfully represented in your published manuscript exactly as you supply it. This is your last opportunity to correct any errors that are present in your manuscript files.

In addition, now that your manuscript has been accepted, please log into EM at <http://www.editorialmanager.com/pone> and update your profile. Click on the "Update My Information" link at the top of the page. Please update your user information to ensure an efficient production and billing process.

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team in advance. Please contact them at ONEpress@plos.org.

Please contact us at plosone@plos.org if you have any questions, concerns, or problems, and thank you for submitting your work to our journal.

With kind regards,
Riccardo Manganelli
Academic Editor
PLOS ONE

Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *Bacillus pumilus* SF214

--Manuscript Draft--

| | |
|-----------------------|--|
| Manuscript Number: | |
| Article Type: | Research Article |
| Full Title: | Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in <i>Bacillus pumilus</i> SF214 |
| Short Title: | Developmental fates in <i>B. pumilus</i> |
| Corresponding Author: | Ezio Ricca Federico II University Naples, ITALY |
| Keywords: | sporulation; pigment formation; carotenoids; cell fate; matrix |
| Abstract: | <p><i>Bacillus pumilus</i> SF214 is a spore forming bacterium, isolated from a marine sample, able to produce a matrix and a yellow-orange, water soluble pigment. Pigmentation is strictly regulated and high pigment production was observed during the late stationary growth phase in a minimal medium and at growth temperatures lower than the optimum. Only a subpopulation of stationary phase cells produced the pigment, indicating that the stationary culture contains a heterogeneous cell population and that pigment synthesis is a bimodal phenomenon. The fraction of cells producing the pigment varied in the different growth conditions and occurred only in cells not devoted to sporulation. Only some of the pigmented cells were also able to produce a matrix. Pigment and matrix production in SF214 appear then as two independent developmental fates both alternative to sporulation. Since the pigment had an essential role in the cell resistance to oxidative stress conditions, we propose that within the heterogeneous population different survival strategies can be followed by the different cells.</p> |
| Order of Authors: | Nicola Manzo Blanda Di Luccia Rachele Isticato Enrica D'Apuzzo Maurilio De Felice Ezio Ricca |
| Suggested Reviewers: | Patrick Eichenberger Center for Genomics and System Biology & Dept of Biology New York University pe19@nyu.edu Charles Moran Jr Emory University School of Medicine Dept. of Microbiology and Immunology moran@microbio.emory.edu Simon Cutting School of Biological Sciences Royal Holloway University of London S.Cutting@rhul.ac.uk Peter Graumann Institute of Biology II Albert-Ludwigs-University of Freiburg, peter.graumann@biologie.uni-freiburg.de Imrich Barak Institute of Molecular Biology Slovak Academy of Science imrich.barak@savba.sk |
| Opposed Reviewers: | |



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Dipartimento di Biologia

Naples, January 28th, 2013

Dear Editor,

please find the manuscript "Pigmentation and Sporulation are Alternative Cell Fates in *Bacillus pumilus* SF214" by N. Manzo, B. Di Luccia, R. Isticato, E. D'Apuzzo, M. De Felice and E. Ricca that we wish to submit for publication on **PLOS ONE**.

In this manuscript we report that growth cultures of a pigmented strain of *Bacillus pumilus* are heterogeneous and contain different cell types. Some cells produce a pigment, others enter the sporulation programme and others form an extra-cellular matrix. Heterogeneity in bacterial cell populations is now a well established phenomenon and has been diffusely studied in *Bacillus subtilis*, the model organism for spore formers. Our system has the disadvantage with respect to *B. subtilis* of being not amenable to genetic manipulation and this has so far precluded us from identifying the genes involved in pigment formation. However, while *B. subtilis* is not pigmented, strain SF214 of *B. pumilus* produces a yellow-orange pigment that is autofluorescent and allows a direct, single-cell analysis by fluorescence microscopy. Taking advantage of this feature we were able to see that pigment formation and sporulation appear as alternative processes and that only a subpopulation of pigmented cells produces an extracellular matrix. The pigment is essential to protect the cell from exposure to oxygen peroxide while spores are protected by other different mechanisms, suggesting that in the heterogeneous population only those cells that will not become spores need to be protected by the pigment.

We wish to submit our manuscript as a **research article**.

Our manuscript **has not been submitted previously** to PLOS ONE or any other journal.

We hope our work is considered suitable for publication on PLOS ONE.

Sincerely,

Ezio Ricca

List of appropriate *PLOS ONE* Academic Editors:

- 1) Peter Setlow
- 2) Adam Driks
- 3) Marie-Joelle Virolle
- 4) Riccardo Manganelli
- 5) Eric Cascales

List of recommended reviewers:

- 1) Patrick Eichenberger
- Center for Genomics and System Biology & Dept of Biology
New York University



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI *FEDERICO II*

Dipartimento di Biologia

1009 Silver Center
100 Washington Square East
New York, NY 10003 USA
Email: pe19@nyu.edu

2) Charlie P. Moran Jr
Emory University School of Medicine
Dept. of Microbiology and Immunology
3010 Rollins Research Center
Atlanta, GA 30322 USA
Email: moran@microbio.emory.edu

3) Simon M. Cutting
School of Biological Sciences
Royal Holloway University of London
Egham, UK
Email: S.Cutting@rhul.ac.uk

4) Peter Graumann
Institute of Biology II
Albert-Ludwigs-University of Freiburg,
Freiburg, Germany
peter.graumann@biologie.uni-freiburg.de

5) Imrich Barak
Institute of Molecular Biology
Slovak Academy of Science
SAS, 845 54 Bratislava 45
Slovak Republic
Email: imrich.barak@savba.sk

Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in
***Bacillus pumilus* SF214**

Nicola Manzo*, Blanda Di Luccia*, Rachele Isticato, Enrica D'Apuzzo,
Maurilio De Felice, Ezio Ricca[¶]

Department of Biology, Federico II University, Napoli, Italy

* Equal contributors

[¶] Corresponding author: Department of Biology
Federico II University
via Cinthia, Monte Sant'Angelo
80126 Napoli, Italy
Phone: 0039081679036
Fax: 0039081679233
Email: ericca@unina.it

Bacillus pumilus SF214 is a spore forming bacterium, isolated from a marine sample, able to produce a matrix and a yellow-orange, water soluble pigment. Pigmentation is strictly regulated and high pigment production was observed during the late stationary growth phase in a minimal medium and at growth temperatures lower than the optimum. Only a subpopulation of stationary phase cells produced the pigment, indicating that the stationary culture contains a heterogeneous cell population and that pigment synthesis is a bimodal phenomenon. The fraction of cells producing the pigment varied in the different growth conditions and occurred only in cells not devoted to sporulation. Only some of the pigmented cells were also able to produce a matrix. Pigment and matrix production in SF214 appear then as two independent developmental fates both alternative to sporulation. Since the pigment had an essential role in the cell resistance to oxidative stress conditions, we propose that within the heterogeneous population different survival strategies can be followed by the different cells.

Introduction

Spore-forming *Bacilli* are aerobic, Gram positive organisms characterized by the ability to differentiate the endospore (spore), a metabolically quiescent and extremely resistant cell type. The soil is generally indicated as the main habitat of aerobic spore formers, however, spores have been found in many diverse environments, including rocks, dust, aquatic environments, and the gut of various insects and animals (1, 2). Such a wide environmental distribution is facilitated by the spore ability to survive long-term absence of water and nutrients and withstand extreme habitats that would kill other cell types (3). Survival is due to the peculiar structure of the spore that is formed by a core, containing a dehydrated cytoplasm and a condensed and inactive chromosome, and by a series of protective layers. An innermost layer is the peptidoglycan-rich cortex that is itself surrounded by additional layers of proteinaceous material, the coat and, in some species, the exosporium (4, 5). Together these components protect the spore from UV radiation, extremes of heat or pH, exposure to solvents, hydrogen peroxide, toxic chemicals and lytic enzymes (3, 6). In the presence of water and appropriate nutrients the spore starts germination, a fast process that causes the breakage and removal of the protective structures and allows outgrowth and resumption of vegetative cell growth (3, 4).

Spore formation is dependent upon environmental conditions that do not allow cell growth, such as a block of DNA replication and a decline of available nutrients (7). In *Bacillus subtilis*, the model organism for spore formers, growing cells are mainly single and highly motile. When those dispersed cells reach the end of the exponential growth phase they can follow alternative developmental pathways with some cells forming long chains, producing a matrix and assembling into multicellular biofilms and others entering the irreversible program of spore formation (8, 9, 10). Therefore, in dispersed cell populations matrix and spore production are mutually exclusive cell fates (8, 11) and are both bimodal processes in which cells follow either one or the other pathway (12, 13). Both developmental cell fates are governed by a regulatory protein, Spo0A-P, that directly activates genes of the sporulation pathway (14) and indirectly acts on matrix synthesis, relieving the repression of genes for

matrix production (*epsA-O* and *yqxM-sipW-tasA* operons) (15, 16, 17). Two mechanisms cooperate to make sporulation and matrix production mutually exclusive: a metabolic control mediated by the intracellular levels of SpoOA-P and a chromosome copy number mechanism that prevents cells that have entered the sporulation pathway from expressing matrix genes (10). Low levels of SpoOA-P induce matrix formation while high levels of the phosphoprotein block matrix formation and activate sporulation. Therefore, in a sporulation-inducing medium, in which SpoOA-P rapidly rises to high levels, cells directly enter sporulation instead of forming a biofilm. Conversely, in a medium in which SpoOA-P remains at low levels biofilm formation is promoted (10). However, extracellular matrix production and sporulation are linked. KinD, a membrane sensor histidine kinase and a component of the Spo0A phosphotransfer network, has been proposed to act as a checkpoint protein able to regulate the onset of sporulation by inhibiting Spo0A activity. KinD would alter its activity, depending on the presence or absence of the extracellular matrix, thus affecting the selective functionality on the master regulator Spo0A to regulate expression of genes involved in matrix production and sporulation (18). Within a biofilm different cell types coexist and display a high degree of spatiotemporal organization with matrix-producing cells that ultimately differentiate into spores (8).

Another interesting feature of some Bacilli is the production of pigments. While *B. subtilis* is not pigmented, isolates of various *Bacillus* species are pigmented and, in most cases, those pigments have been identified as carotenoids and proposed to provide resistance to UV irradiation and reactive oxygen species (19, 20, 21, 22). A pigmented strain of *Bacillus pumilus*, SF214, isolated from a marine sample, has been previously described (20). SF214 is a moderate halophilic bacterium able to form a matrix and to produce an orange to red water-soluble pigment, i.e. a pigment that can not be partitioned into organic solvents but is retained in the aqueous phase (20). The inability to partition this pigment into organic solvents, to resolve it by HPLC and to obtain characteristic carotenoid UV/VIS spectra, has precluded its definitive assignment as a carotenoid (20). However, the spectral peak at 410 nm shown by aqueous extracts of SF214 (20) is likely to represent a protein-associated

72 carotenoid, as previously described for carotenoproteins extracted from crawfishes (23).
73 Here we report that in SF214 pigment production is a highly regulated process that occurs
74 during the stationary growth phase only in cells not devoted to spore formation. Pigment
75 production in SF214 then appears as a bimodal phenomenon alternative to sporulation,
76 parallel to matrix biosynthesis and essential to grant cell resistance to oxidative stress.
77

RESULTS

Pigment production is dependent on growth-phase, -temperature and -medium

Synthesis of the water-soluble pigment produced by SF214 is a strictly regulated process as it depends on the growth-phase, -temperature and -medium. Pigment production was shown to be strongly induced only 8-10 hours after that cells have entered the stationary growth phase at 37°C in rich (LB) medium (Fig. 1A). Although SF214 is a mesophilic bacterium and its optimal growth temperature is 37°C, the maximal production of the pigment was observed at 25°C (Table 1). Compared with cells grown at 25°C a slightly decreased synthesis of pigment was observed at 30°C, while more than 2-fold and about 6-fold decreased synthesis was observed at 37°C and at 42°C, respectively (Table 1). The absorbance spectrum of cell extracts of SF214 between 300 and 500 nm (20) showed that cells grown at 25°C produced about 4-fold more pigment in a minimal (S7; black symbols in Fig. 1B) than in a rich (LB; gray symbols in Fig. 1B) medium, while in a sporulation-inducing (DS; white symbols in Fig. 1A) medium the synthesis of pigment was almost abolished.

Heterogeneity of pigment production

Previous reports have shown that carotenoids produced by the yeast *Phaffia rhodozyma* (24) or the halotolerant green alga *Dunaliella salina* (25) autofluoresce and that such property can be used to follow carotenoid production by fluorescence microscopy. We found that the water-soluble pigment of SF214 is also autofluorescent and that the fluorescence is not localized but rather diffuse in the cell cytoplasm. Interestingly, in the cell culture only some of the cells are fluorescent. Fig. 2 shows a representative microscopy field observed by phase contrast (left) and fluorescent microscopy either following the autofluorescence (middle) or after DAPI-staining (right). The enlarged panels of Fig. 2 clearly show that only some of the DAPI-stained cells were autofluorescent.

Two lines of evidence support our conclusion that the observed autofluorescence was actually due to the water-soluble pigment: i) unpigmented Bacilli (including other isolates of *B. pumilus*) did not show any fluorescence under identical experimental conditions (not

shown); ii) the number of autofluorescent cells varied consistently with the variations of pigment production observed at various growth-phase, -temperature and -medium. As shown in Fig. 3, the number of fluorescent cells was higher in a stationary than in an exponential cultures (left panels), in cells grown at 25°C than in cells grown at 37°C (middle panels) and in cells grown in minimal (S7) than in rich medium (LB) (right panels). For each condition considered in Fig. 3, different microscopy fields were analyzed and over 1,000 cells for each condition counted. This analysis indicated that the increased production of pigment observed on the base of growth-phase, -temperature and -medium is not due to a higher production of carotenoid by each producing cell but rather to an increased proportion of cells able to produce the pigment. Restriction of pigment synthesis to a subpopulation of cells indicates that late stationary cultures of SF214 contain a heterogeneous population of cells and that pigment formation is a bimodal process.

Pigment synthesis only occurs in cells not devoted to sporulation

Free spores as well as immature spores still contained within the mother cells are known to autofluoresce (26). However, in sporangia containing an almost mature spore the fluorescence always appeared limited to the prespore and not diffused in the mother cell cytoplasm. Fig. 4 shows a representative microscopy field with sporulating cells of SF214 observed by phase contrast (left), autofluorescence (middle) and the merge (right): while only some cells autofluoresced with a fluorescence diffused in the cytoplasm, fluorescence associated to sporangia containing an almost mature spore is clearly limited to the forming spore. This observation, together with experiments reported in Fig. 1B indicating that when grown in a sporulation-inducing (DS) medium SF214 cells did not produce the pigment, suggests that pigment production in *B. pumilus* SF214 is mutually exclusive with spore formation.

To better address this point we analyzed SF214 cells by pigment-driven autofluorescence (green) and by immunofluorescence due to anti-CotE primary antibody and fluorescent secondary antibody (red). CotE is a spore coat protein (27), produced early during

sporulation, known to localize on the spore surface (26). For our analysis antibody raised against CotE of *B. subtilis* were used (28). In a preliminary experiment this antibody was shown to specifically react against a protein of *B. pumilus* SF214 corresponding in size to CotE of *B. subtilis* (Suppl. Mat. 1). Fig. 5 reports representative microscopy fields of fluorescence and immunofluorescence microscopy analysis of SF214 cells grown in LB at 37°C up to the early stationary growth phase. In this analysis we observed that, similarly to what observed in *B. subtilis* (26), also in *B. pumilus* CotE is localized around the forming spore, and that cells recognized by the anti-CotE antibody were all not autofluorescent. We never observed yellow cells, which would have been indicative of cells producing the pigment (green signal) and the spore-specific protein CotE (red signal) (see the merged panels of Fig. 5 for some examples). Therefore, based on the experiments of Figs. 4 and 5 we conclude that pigment synthesis and sporulation are alternative developmental pathways and occur in different cell subpopulations.

Matrix synthesis occurs only in a subpopulation of pigmented cells

In *B. subtilis* sporulation and matrix formation are alternative developmental programmes (11). Since SF214 also forms a matrix (20) we verified whether also in this bacterium matrix formation and sporulation are alternative and whether matrix and pigment synthesis can occur in the same cells. To this aim we analyzed SF214 cells by pigment-driven autofluorescence (green) and by immunofluorescence due to anti-TasA primary antibody and fluorescent secondary antibody (red). TasA is a major protein component of the *B. subtilis* biofilm (15), encoded by the third gene of the *yqxM-sipW-tasA* operon (16, 29). For our analysis we used antibody raised against TasA of *B. subtilis* (a gift of A. Driks). Preliminary experiments showed that a protein homologous to TasA of *B. subtilis* can be extracted from spores of strain SF214 and that this protein is recognized by the anti-TasA antibody (Suppl. Mat. 2). The homology with the protein of SF214 starts at position 24 of TasA, which corresponds to the first amino acid residue of the mature form of TasA after the proteolytic maturation of pre-TasA (29, 30) (Suppl. Mat. 2). Fig. 6 reports representative microscopy

fields of fluorescence and immunofluorescence microscopy analysis of SF214 cells grown in minimal (S7) medium at 25°C up to the early stationary phase. This analysis showed that: i) cells that were not autofluorescent and therefore devoted to sporulation (indicated by white arrows in Fig. 6A) were never recognized by the anti-TasA antibody, and ii) only some of the autofluorescent cells were recognized by anti-TasA antibody (yellow cells in Fig. 6). Panel B of Fig. 6 shows some examples of autofluorescent cells that are not recognized by anti-TasA antibody. Those results indicate that as in *B. subtilis* also in *B. pumilus* SF214 sporulation and matrix formation are alternative and that matrix synthesis occurs only in a subpopulation of pigmented cells.

The pigment of SF214 is essential for the cell resistance to hydrogen peroxide

In non-photosynthetic organisms pigments have been associated to cell resistance to UV irradiation and reactive oxygen species (20, 21, 22). To analyze the role of the SF214 pigment we isolated an unpigmented mutant after nitrosoguanidine (NTG) mutagenesis (31) (Suppl. Mat. 3). To this aim mid-exponential phase cells were incubated for different times with 10 µg of NTG and the percentage of survival assessed by CFU determination (Suppl Mat. 3B). To minimize the possibility to have mutants carrying multiple mutations, we only analyzed cells exposed to NTG for the shortest time. NTG-treated cells were then diluted, plated and checked for pigmentation after 36 hours of incubation at 25°C. One unpigmented mutant, SF214-Mut, was chosen for further analysis. Although we could not isolate the mutation responsible for loss of pigmentation, as several attempts to transform SF214 with either plasmid or chromosomal DNA resulted unsuccessful (not shown), we were able to show that the unpigmented phenotype reverted spontaneously at a frequency of 1 clone out of 10⁹, thus suggesting that the NTG treatment had not produced multiple mutations. Analysis of the aqueous extracts showed that the mutant does not produce any molecule able to adsorb at 410 nm (Suppl Mat 4) and, consistently, a fluorescence microscopy analysis

showed that no fluorescent cells were present in a stationary phase culture of the unpigmented mutant (Suppl Mat 5).

SF214 and its unpigmented derivative were used to analyze the cell response to hydrogen peroxide. Cells of the two strains were grown at 25°C in minimal (S7) liquid medium and collected 10 hours after the entry into stationary phase of growth. Cells were then incubated with 30 mM of hydrogen peroxide and analyzed for viability after various incubation times. While wild type cells were all viable after exposure to hydrogen peroxide for up 30 minutes and showed a reduced viability only after 45, 60 and 90 minutes of treatment, the unpigmented mutant showed a clear decrease of viability at all the incubation times (Fig. 7). In a parallel experiment spores of both strains were totally resistant to the hydrogen peroxide treatment at all the time points tested (Fig. 7). Results of Fig. 7 confirm that the pigment has a role in the response of vegetative cells to oxidative stress. Spores do not contain the pigment but are totally resistant to hydrogen peroxide due to other, pigment-independent mechanisms (6, 32).

Discussion

Main result of this report is the observation that pigment production in SF214, a marine isolate of *B. pumilus*, is a bimodal phenomenon alternative to sporulation. SF214 cells in stationary growth phase form a heterogeneous population able to follow diverse developmental fates. Some cells start the sporulation programme while others produce the pigment. Only a subpopulation of pigmented cells also produces a matrix. This is reminiscent of the situation found in the unpigmented *B. subtilis*. Seminal studies performed using *B. subtilis*, the model organism for spore formers, have shown that in dispersed cell populations spore formation, matrix production, competence to acquire external DNA and production of extra-cellular proteases are all bimodal processes (9, 10, 12). Spore and matrix formation appear as alternative developmental pathways with some cells producing a matrix and others entering the irreversible program of spore formation (8, 9, 10). In addition to those two also other cell fates are alternative in *B. subtilis*: within a biofilm, only a subpopulation of *B. subtilis* cells produce surfactin but, while surfactin-producers do not respond to their own surfactin, other cells do and become matrix producers. In this case, individual *B. subtilis* cells simultaneously expressing genes for both surfactin and matrix synthesis have never been observed (11). These two subpopulations do not include the entire population and the rest of the cells that do not differentiate as surfactin or matrix producers probably originate the other cell types known to be present in *B. subtilis* populations (13). In this frame each differentiation fate sets the stage for a subsequent cell type. For example, within biofilms matrix-producing cells are initially predominant and later differentiate and become spores (8). By analogy, we propose that *B. pumilus* SF214 dispersed stationary cells also form a heterogeneous population able to follow diverse developmental fates. Some cells enter the irreversible sporulation cycle forming the highly resistant but metabolically quiescent spore while other cells follow a different survival strategy and produce a pigment able to protect the cell from oxidative conditions. Cell diversification and the ability to develop different survival strategies in *B. pumilus* SF214 can then be viewed as a risk spreading (or bet hedging) strategy. Such stochastic switches between phenotypic states have been found in diverse

organisms ranging from bacteria to humans and are considered among the earliest evolutionary solutions to adapt and facilitate persistence in fluctuating environments (33). Only a subpopulation of pigment-producing cells forms an extracellular matrix. It is not clear whether matrix-production can also be viewed as a survival strategy in specific environments however, the existence of more than two developmental cell fates is not surprising but rather expected on the base of what previously observed in *B. subtilis* (13).

An additional result of this work comes from the observation that pigment formation is a highly regulated process. Growth conditions affect pigment synthesis most probably regulating the number of cells that become able to synthesize the pigment. This conclusion is supported by the number of fluorescent vs. not fluorescent cells in diverse microscopy fields (Fig. 3). Although our analysis does not allow us to assess the amount of pigment synthesized at a single-cell level in the various conditions, it clearly shows that a regulation is exerted when the single stationary cell turns its fate towards either sporulation or pigment synthesis.

Strain SF214 of *B. pumilus* is a field isolate and our attempts to genetically manipulate it have been so far unsuccessful. Several attempts to transform SF214 with chromosomal DNA of an antibiotic-resistant strain of *B. pumilus* or with a non replicative plasmid have all been unsuccessful. SF214 contains a large natural plasmid. We obtained a cured strain which did not show any apparent phenotypic difference with respect to SF214 but that was still refractory to transformation. The impossibility to manipulate SF214 has so far impaired a deeper molecular analysis of the various developmental fates of SF214 and of the regulatory proteins involved. A future challenging task will be to verify whether the master regulator Spo0A, known to control matrix formation and sporulation, as well as other cell fate regulators of *B. subtilis* such as ComX and SinI/R, is also involved in pigment development in *B. pumilus*.

Methods

Bacterial growth conditions and spore induction and purification

Bacilli were grown either in LB medium (for 1 l: 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-yeast extract, 10 g NaCl, pH 7.0) or in Difco-Sporulation-inducing (DS) medium or in minimal S7 medium (50mM MOPS, 10mM (NH₄)₂SO₄, 5mM potassium phosphate pH 7.0, 2mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂, 50 µM MnCl₂, 10 µM ZnCl₂, 5 µM FeCl₃, 2 µM thiamine hydrochloride, 20mM sodium glutamate, 1% glucose, 0.1 mg/ml phenylalanine, 0.1 mg/ml tryptophan) in aerobic conditions. For spore production cells were grown in DS medium in aerobic conditions for 48 hours (31). Spores were collected by centrifugation and purified by repeated washes and lysozyme treatment, as previously reported (34). The *B. subtilis* strains used as reference were PY79 (wild type) (35) and the isogenic BZ213 (*cotE::cat*) (27).

Pigment extraction and detection

For pigment extraction, cultures were centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes. The cell pellet was suspended in a lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 10% glycerol) and sonicated at 4°C for 10 min (30 sec. ON and 30 sec. OFF). The pellet was completely removed by centrifugation at 13000 rpm for 15 minutes. Protein concentration of the various extracts was determined spectrophotometrically and aliquots of identical protein concentration used to determine the adsorbance spectrum between 300 and 550 nm, as previously reported (20).

Hydrogen peroxide assays

Vegetative cells and spores were diluted to a concentration of approximately 10⁸ CFU/ml in PBS, and 1 ml of the cell suspensions placed in a 1.5 ml microcentrifuge tube. 30 mM H₂O₂ (Sigma) was added to the cell suspensions at the concentration of 30 mM. Spores or cell suspensions were incubated at room temperature with continuous gentle mixing. After various incubation times 100-µl samples were removed, immediately diluted, plated onto LB agar plate and incubated in order to determine the number of colonies.

285

286 **Fluorescence and immunofluorescence microscopy**

287 For autofluorescence and DAPI staining 200 μ l aliquots of cell culture were centrifuged (2
288 min 6,000 g) and cells resuspended in 20 μ l of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4).
289 Only for the DAPI staining PBS contained 0.1 μ g/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole
290 dihydrochloride (DAPI). Six microliters of each sample were placed on microscope slides and
291 covered with a coverslip previously treated for 30 seconds with poly-L-lysine (Sigma).
292 Samples were observed with an Olympus BX51 fluorescence microscope using a
293 Fluorescein-Isothiocyanate (FITC) or DAPI filters to visualize the fluorescence of the cells.
294 Typical acquisition times were 2000 ms for autofluorescence and 100 ms for DAPI and the
295 Images were captured using a Olympus DP70 digital camera and processed.
296 Immunofluorescence was performed essentially as described by Azam et al (2000) (36), with
297 a few modifications. Bacteria were fixed for 1 hour at room temperature in 80% methanol,
298 washed, briefly treated with lysozyme and fixed to poly-L-lysine-treated coverslip slides to
299 improve micrographs resolution. The coverslips were air dried and pretreated with 5% (w/v)
300 dried milk in PBS, prior to incubation overnight at 4°C with the primary antibodies. In
301 particular, a 1:400 dilution of anti-CotE (raised in mouse) and a 1:300 dilution for anti-TasA
302 (raised in rabbit) were used. After ten washes, the samples were incubated with a 1000-fold
303 diluted specific secondary antibody conjugates with Tetramethyl Rhodamine, TRITC (Santa
304 Cruz Biotechnology, Inc.) for 2 hours at room temperature in the dark. After ten washes the
305 coverslips were covered with one drop (30 μ l) of Component C (Slow Fade: Molecular Probe
306 S-2828) containing 0.1 μ g/mL of DAPI. After 5 minutes the liquid was aspirated and the
307 coverslips mounted onto microscope slides adding one drop of Component A (Slow Fade:
308 Molecular Probe S-2828). The microscope slides were analyzed as described above.

Acknowledgements

We thank Richard Losick for critical reading of the manuscript, Adam Driks for providing the anti-TasA antibody, Saad Fakhry for his contribution to the mutagenesis experiments and Luciano Di Iorio for technical assistance.

References

1. Hong HA, To E, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM (2009) Defining the natural habitat of *Bacillus* sporeformers. *Res Microbiol.* 160:375-379.
2. Cutting SM, Hong HA, Baccigalupi L, Ricca E (2009) Oral Vaccine Delivery by Recombinant Spore Probiotics. *Int Rev Immunol* 28:487–505.
3. Nicholson WJ, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:548-572.
4. Henriques AO, Moran CP Jr. (2007) Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Ann. Rev. Microbiol.* 61:555–588.
5. McKenney PT, Driks A, Eichenberger P (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* 11:33-44.
6. Setlow P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol.* 101:514-525.
7. Lopez D, Vlamakis H, Kolter R (2009) Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* 33:152–163.
8. Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R (2008) Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 22:945–953.
9. Chai Y, Norman T, Kolter R, Losick R (2010) An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 24: 754–765
10. Chai Y, Norman T, Kolter R, Losick R (2011) Evidence that metabolism and chromosome copy number control mutually exclusive cell fates in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 30:1402-1413.
11. Lopez D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2009) Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev* 23:1631-1638.
12. Chai Y, Chu F, Kolter R, Losick R (2008) Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 67:254-263.
13. Veening JW, Smits WK, Kuipers OP. (2008) Bistability, epigenetics, and bet-hedging

in bacteria. *Ann Rev Microbiol.* 62:193-210.

14. Fujita M, Losick R (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev* 19: 2236–2244
15. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 59: 1229–1238
16. Chu F, Kearns DB, Branda SS, Kolter R, Losick R (2006) Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 59: 1216–1228.
17. Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R (2010) Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2230–2234.
18. Aguilar C, Vlamakis H, Guzman A, Losick R, Kolter R (2010) KinD Is a Checkpoint Protein Linking Spore Formation to Extracellular-Matrix Production in *Bacillus subtilis* Biofilms. *mBio* 1:1 doi: 10.1128/mBio.00035-10.
19. Duc LH, Fraser P, Cutting SM (2006) Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *FEMS Microbiol Lett* 255:215–224.
20. Khaneja R, Perez-Fons L, Fakhry S, Baccigalupi L, Steiger S, To E, Sandmann G, Dong TC, Ricca E, Fraser PD, Cutting SM (2010) Carotenoids found in *Bacillus*. *J. Appl. Microbiol* 108:1889–1902.
21. Manzo N, D'Apuzzo E, Coutinho PM, Cutting SM, Henrissat B, Ricca E. (2011) Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation. *BMC Microbiol.* 11:198 doi:10.1186/1471-2180-11-198.
22. Steiger S, Perez-Fons L, Fraser PD, Sandmann G. (2012) Biosynthesis of a novel C30 carotenoid in *Bacillus firmus* isolates. *J. Appl. Microbiol* 110:888-895.
23. Cremades O, Ponce E, Corpas R, Gutierrez JF, Jover M, Alvarez-Ossorio MC, Parrado J, Bautista J (2001) Processing of crawfish (*Procambarus clarkii*) for the preparation of carotenoproteins and chitin. *J Agric Food Chem* 49:5468–5472.
24. An G-H, Suh O-S, Kwon H-C, Kim K, Johnson EA (2000) Quantification of

- carotenoids in cells of *Phaffia rhodozyma* by autofluorescence. Biotechnol Letters 22:1031–1034.
25. Kleinegris D, van Es MA, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH. 2010. Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. J Appl Phycol 22:645–649
 26. Pogliano K, Harry E, Losick R (1995) Visualization of the subcellular location of sporulation proteins in *Bacillus subtilis* using immunofluorescence microscopy. Mol Microbiol. 18:459-470.
 27. Zheng L, Donovan WP, Fitz-James PC, Losick R (1988) Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. Genes Dev. 2:1047-1054.
 28. Isticato R, Pelosi A, De Felice M, Ricca E (2010) CotE binds to CotC and CotU and mediates their interaction during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 192: 949-954.
 29. Serrano, M, Zilhao R, Ricca E, Ozin AJ, Moran CP, Henriques A (1999) A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function. J. Bacteriol 181:3632–3643.
 30. Stover AG, Driks A (1999) Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. J Bacteriol. 181:1664-1672.
 31. Cutting, S. and P. B. Vander Horn. (1990) Genetic analysis In: C. Harwood C; Cutting SM, editors. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, UK pp. 27-74.
 32. Bosak T, Losick RM, Pearson A (2008) A polycyclic terpenoid that alleviates oxidative stress. Proc. Natl Acad Sci USA 105:6725–6729.
 33. Beaumont HJE, Gallie J, Kost C, Ferguson GC, Rainey PB (2009) Experimental evolution of bet hedging. Nature 462:90-94.
 34. Nicholson WL, Setlow P (1990) Sporulation, germination and outgrowth. In: C. Harwood C; Cutting SM, editors. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, UK. pp. 391-450.

35. Youngman P, Perkins JB, Losick R (1984) A novel method for the rapid cloning in *Escherichia coli* of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA adjacent to Tn917 insertion. Mol. Gen. Genet. 195:424-433.
36. Azam TA, Hiraga S, Ishihama A (2000) Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. Genes Cells 5:613-626.

Figure legends

Fig. 1 (A) Growth curve of SF214 at 37°C in rich (LB) medium (black symbols) were determined by following over time the optical density of the culture at 600 nm. Pigment production (white symbols) was determined by measuring over time the optical density of 1 ml of cell-free culture supernatant at 410 nm. (B) Absorbance spectrum between 300 and 500 nm of 360 µg of cell extracts of SF214 grown at 25°C in minimal (S7) (black symbol), rich (LB) (gray symbol) and sporulation-inducing (DS) medium.

Fig. 2 Observation of the same microscopy field observed by phase contrast (left), autofluorescence (middle) and DAPI staining (right). The same section of each panel is enlarged.

Fig. 3 Microscopy fields of SF214 cells grown in different conditions and observed by phase contrast and autofluorescence and compared to assess the proportion of fluorescent vs not fluorescent cells. Left panel: exponential vs. stationary growth phase (in LB medium at 37°C); middle panel: 25°C vs. 37°C as growth temperature (in LB medium for 24 hours); right panel: minimal (S7) vs. rich (LB) growth medium (stationary cells grown at 25°C). For each panel a graph reports the percentage of fluorescent (gray bars) vs. not fluorescent (black bars) cells. For each condition a total of 300 cells from 5 different microscopy fields were counted. Spores and cells containing a prespore were not counted.

Fig. 4 The same microscopy field observed by phase contrast (left), autofluorescence (middle). The right panel reports the merge of phase contrast and autofluorescence images. Cells were grown in rich (LB) medium for 15 hours.

Fig. 5 Microscopy analysis of cells from different fields observed by phase contrast, DAPI-staining, immunofluorescence with anti-CotE primary antibody and Texas Red conjugated secondary antibody merged with the DAPI, autofluorescence and immunofluorescence with

anti-CotE primary antibody and Tetramethyl Rhodamine (TRITC) conjugated secondary antibody merged with the autofluorescence.

Fig. 6 Microscopy analysis of cells from different fields observed by phase contrast, immunofluorescence with anti-TasA primary antibody and Texas Red conjugated secondary antibody, autofluorescence and immunofluorescence with anti-TasA primary antibody and Tetramethyl Rhodamine (TRITC) conjugated secondary antibody merged with the autofluorescence. Panel A reports examples of cells that are not autofluorescent and that are also not recognized by anti-TasA, indicated by arrows. Panel B focuses on examples of fluorescent cells, with some recognized (yellow in the merge) and some not recognized by anti-TasA antibody.

Fig. 7 Cell and spore survival after treatment with H_2O_2 (30 mM) for various times. For each time point the CFU of cells (gray symbols) and spores (white symbols) of the wild type (squares) and the mutant (circles) strains was obtained by plating on LB plates and incubation for 24 hours at 37°C.

Table 1

Growth and pigment production of SF214 at different temperatures

| Temp (°C) | Generation time ^a | Pigment ^b |
|-----------|------------------------------|----------------------|
| 4 | 0 | - |
| 25 | 95 | 1.822 |
| 30 | 80 | 1.412 |
| 37 | 60 | 0.745 |
| 42 | 65 | 0.288 |
| 50 | 0 | - |

^a minutes in LB liquid medium;

^b OD values at 410 nm of 1 ml of cell-free supernatants of cells grown for 24 hours in rich (LB) medium.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

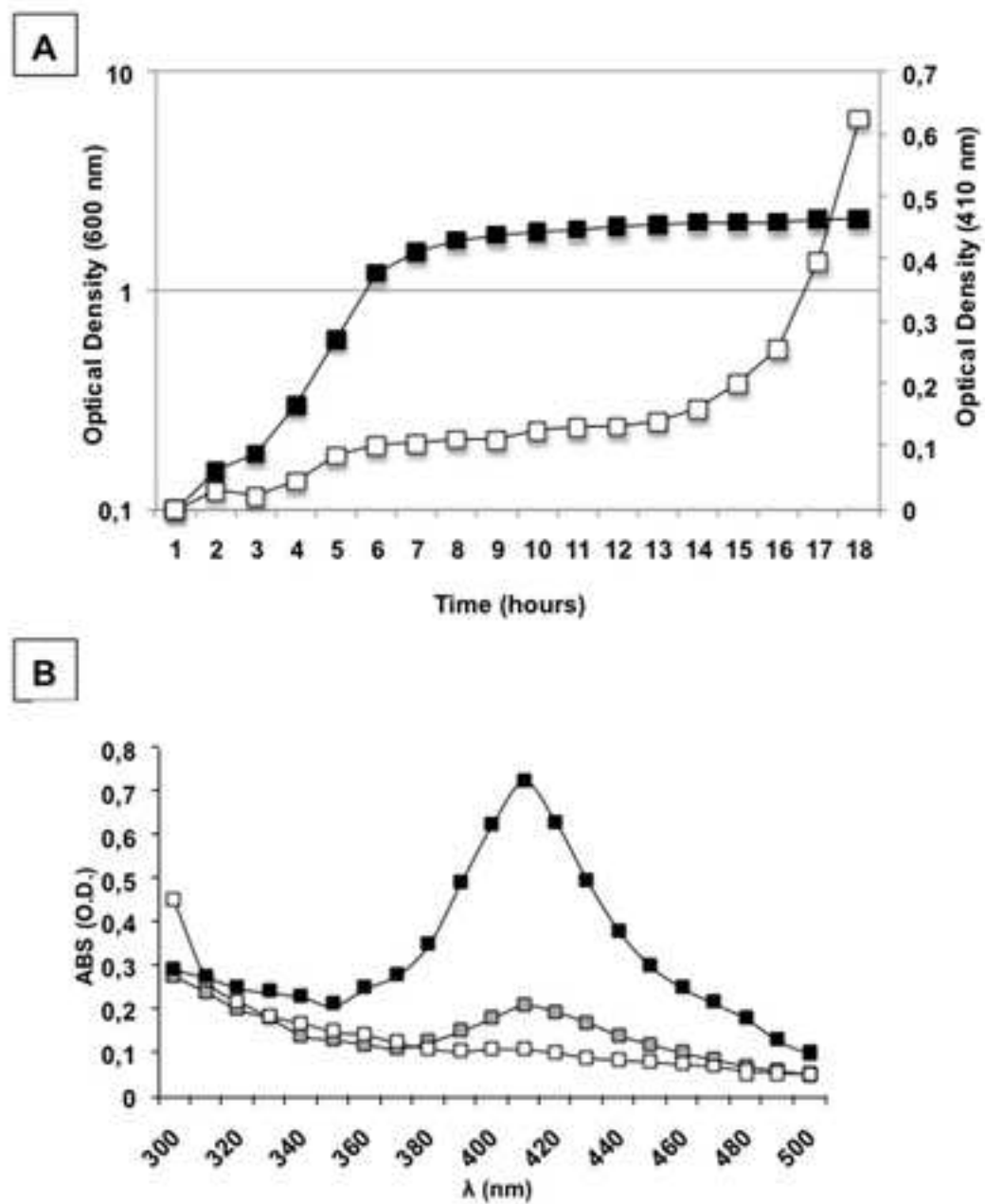


Fig. 1

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

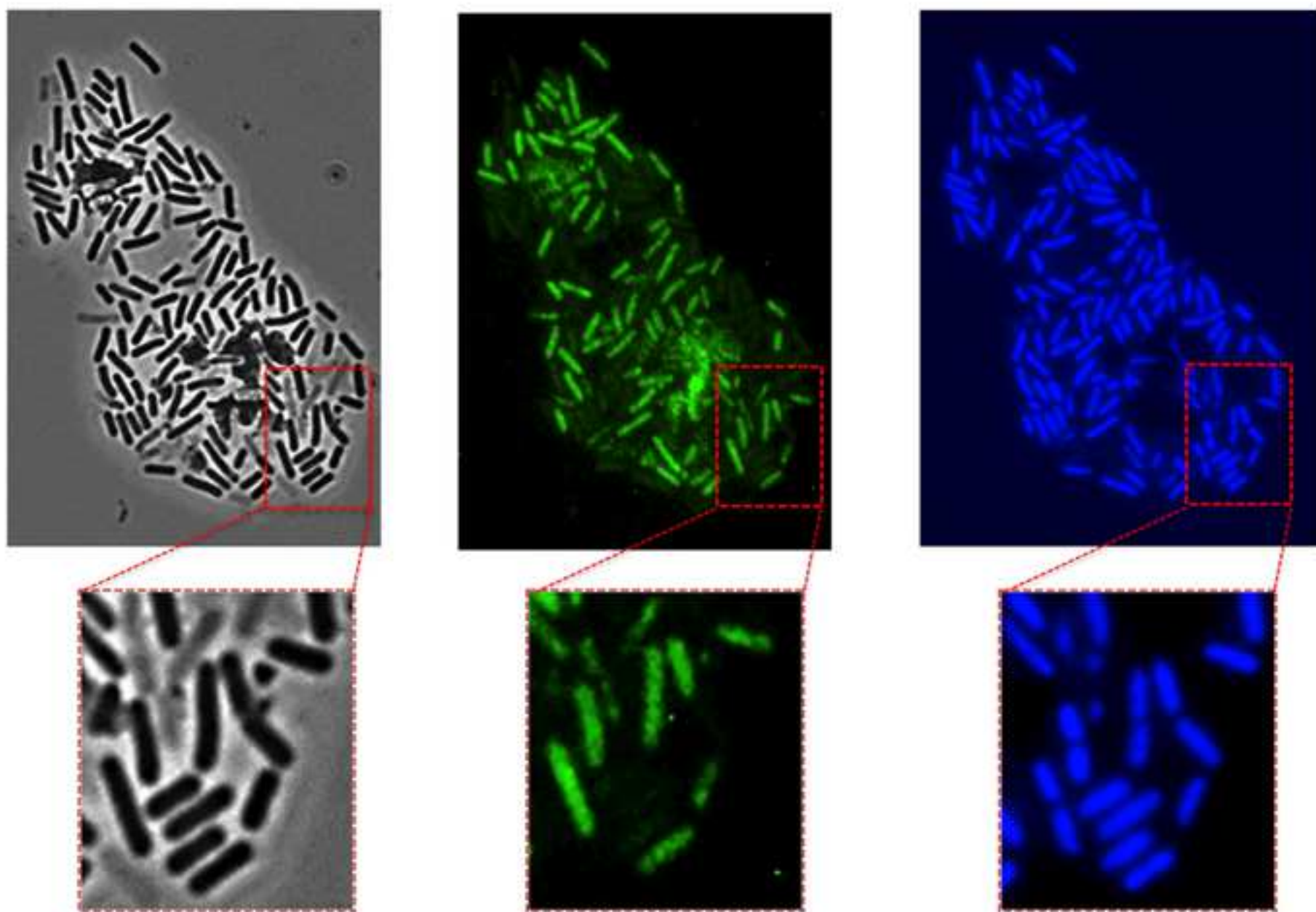


Fig. 2

Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

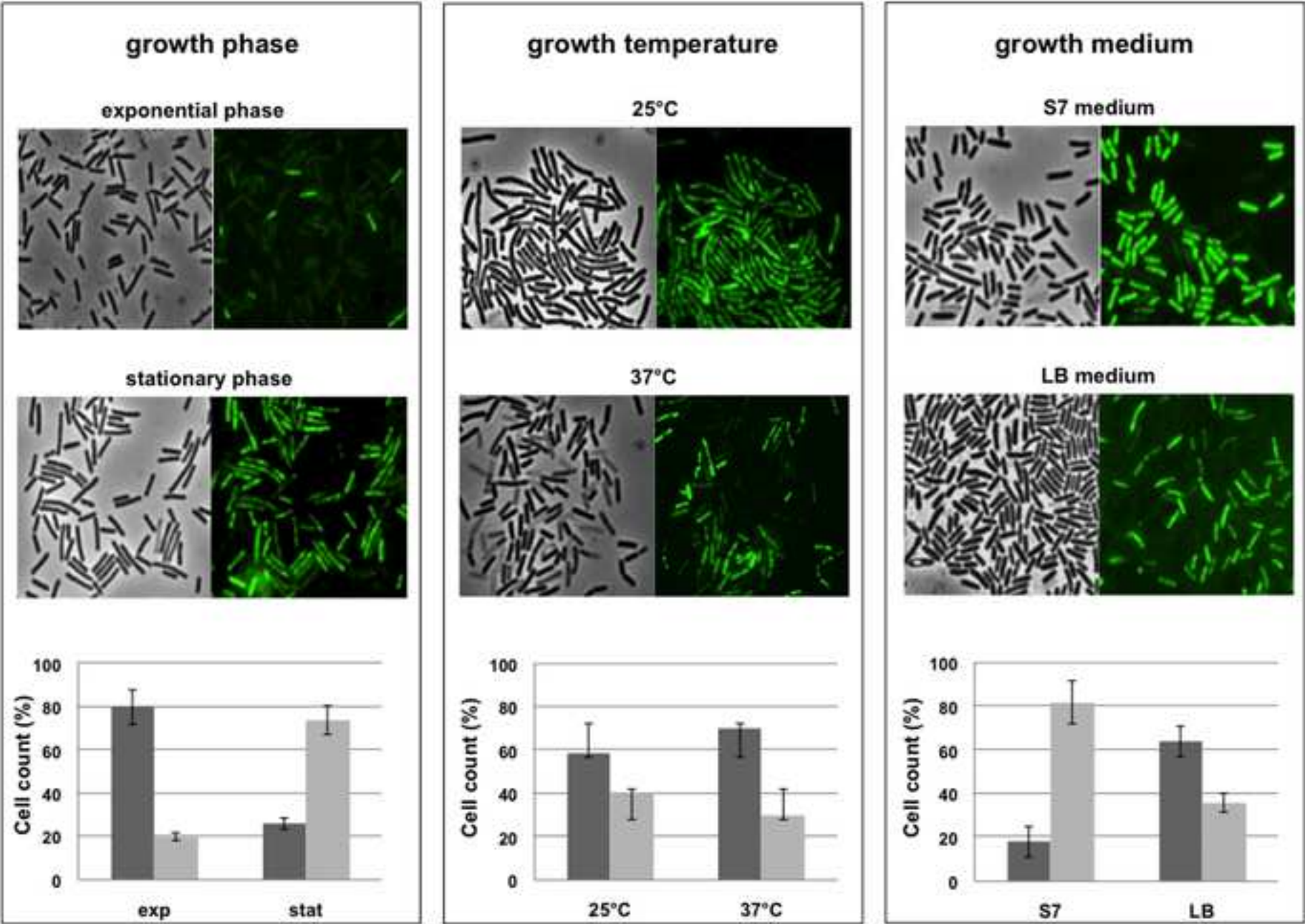


Fig. 3

Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

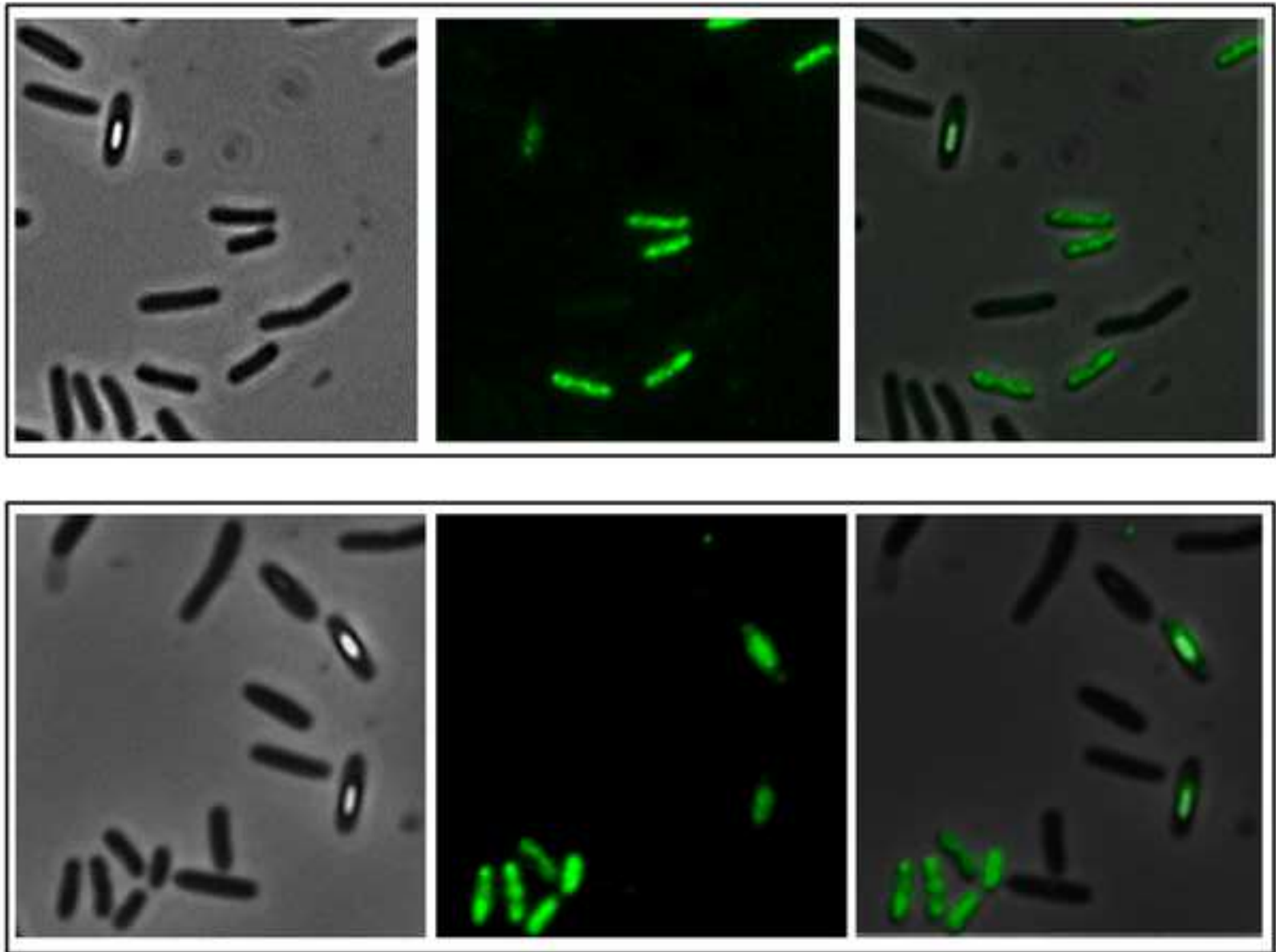


Fig. 4

Figure 5a
[Click here to download high resolution image](#)

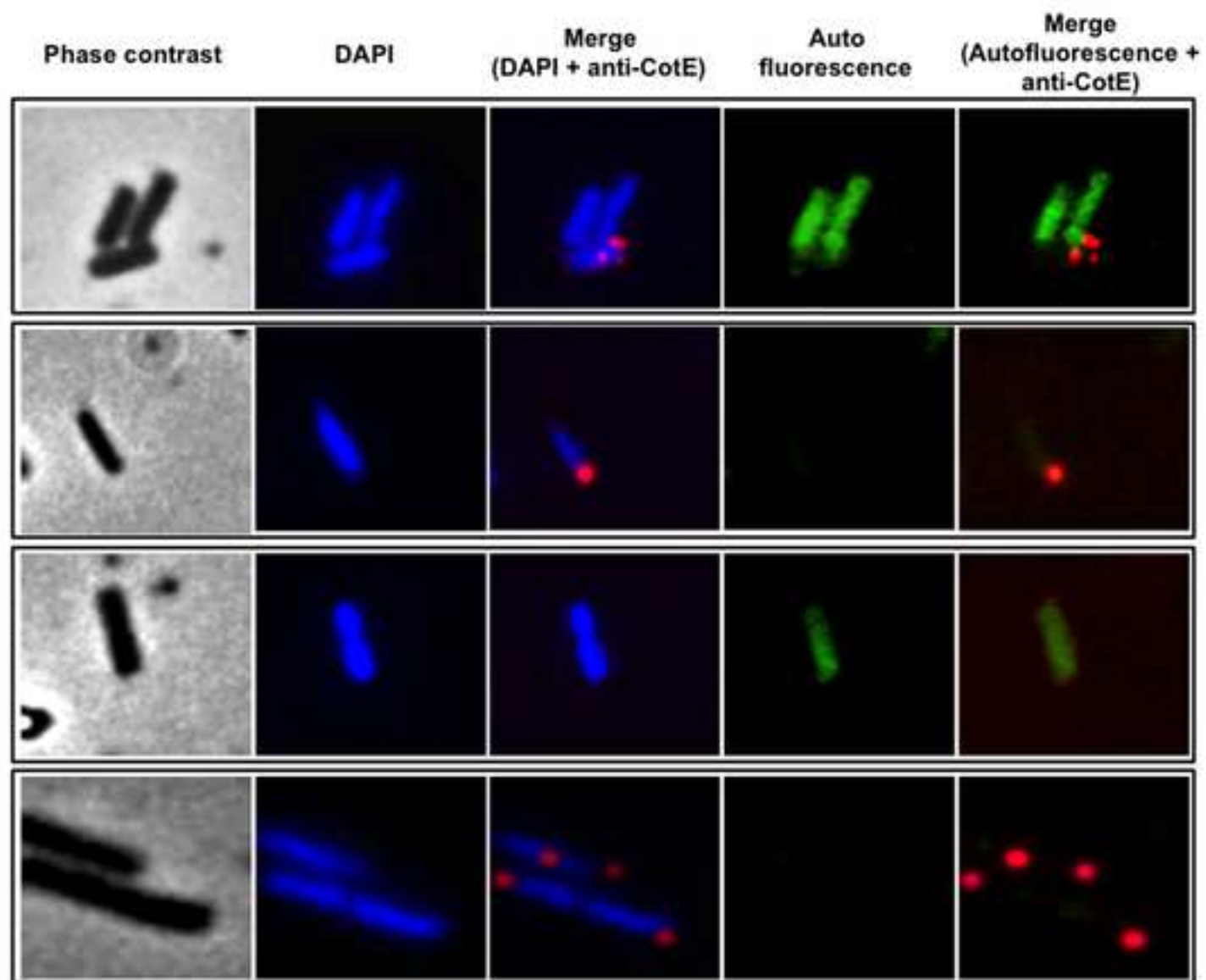


Fig. 5-I

Figure 5b
[Click here to download high resolution image](#)

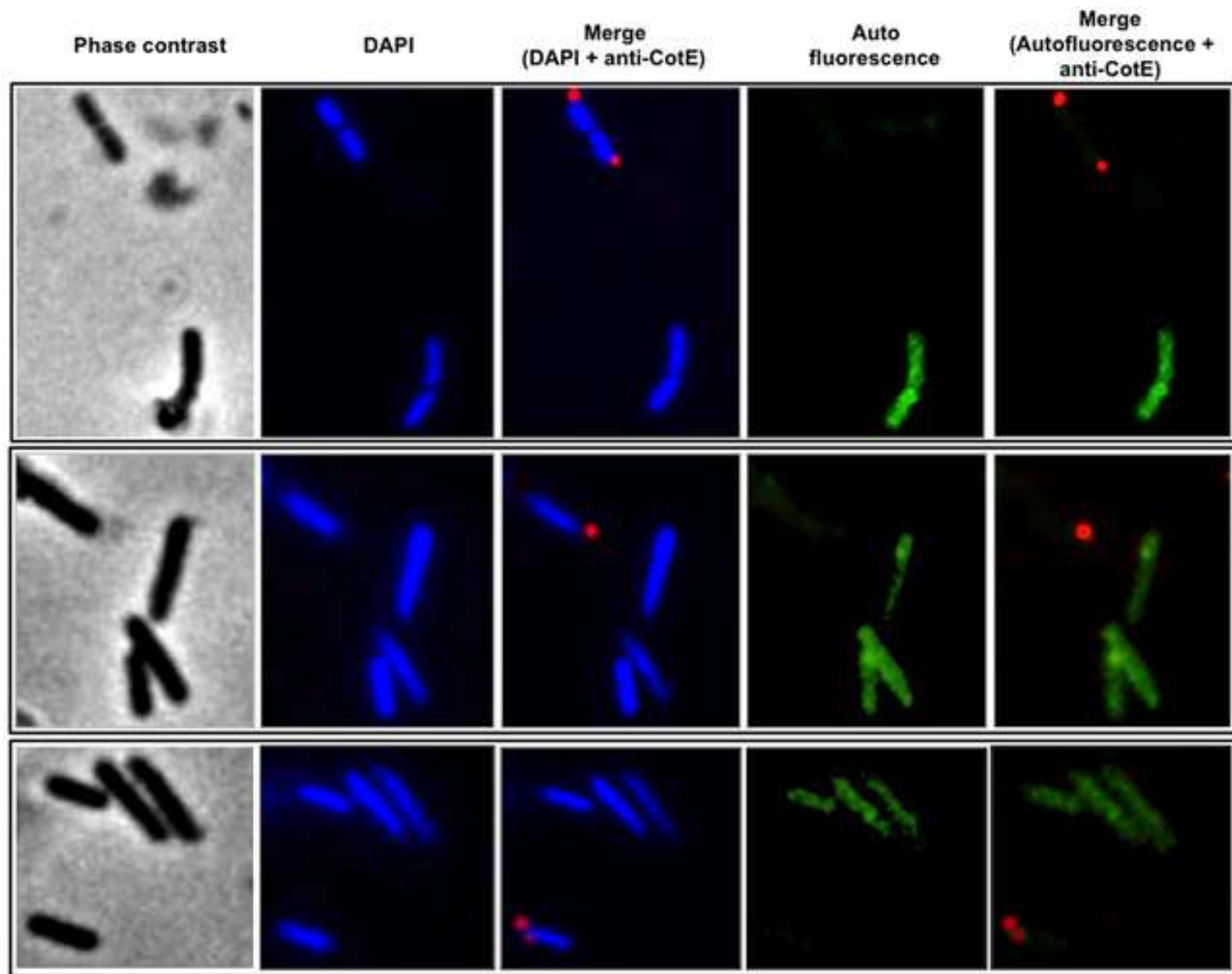


Fig. 5-II

Figure 6a
[Click here to download high resolution image](#)

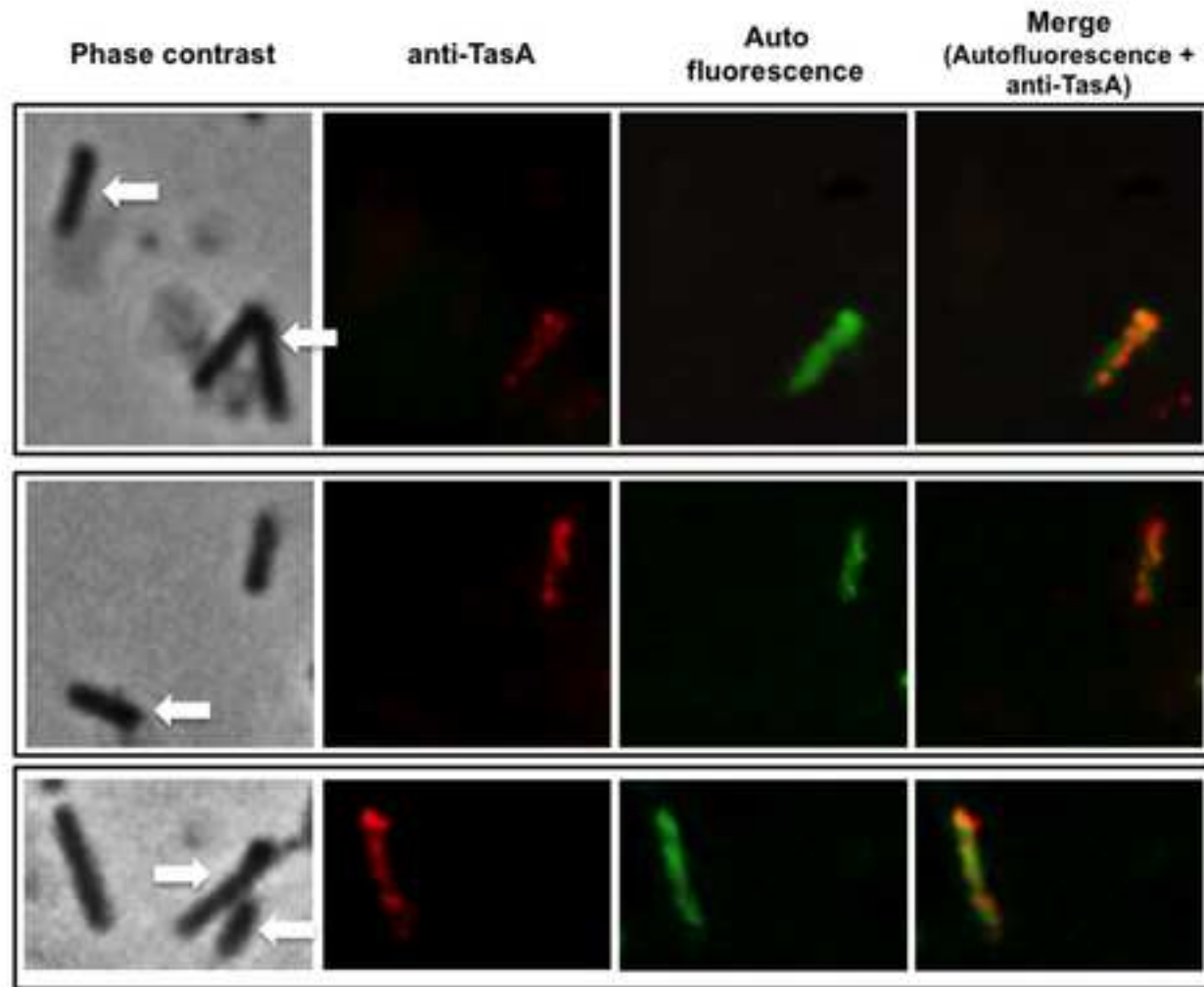


Fig. 6A

Figure 6b
[Click here to download high resolution image](#)

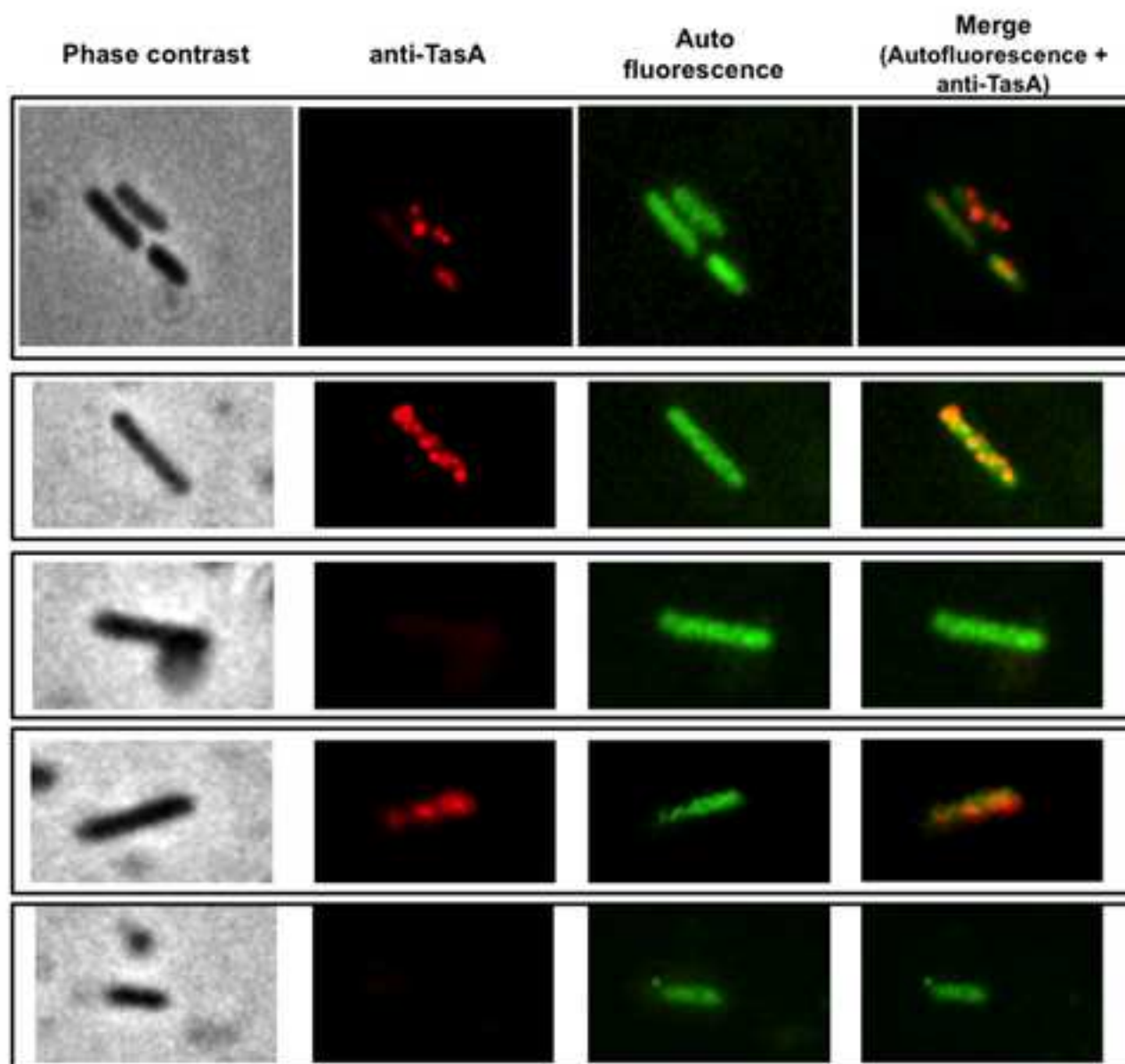


Fig. 6B

Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

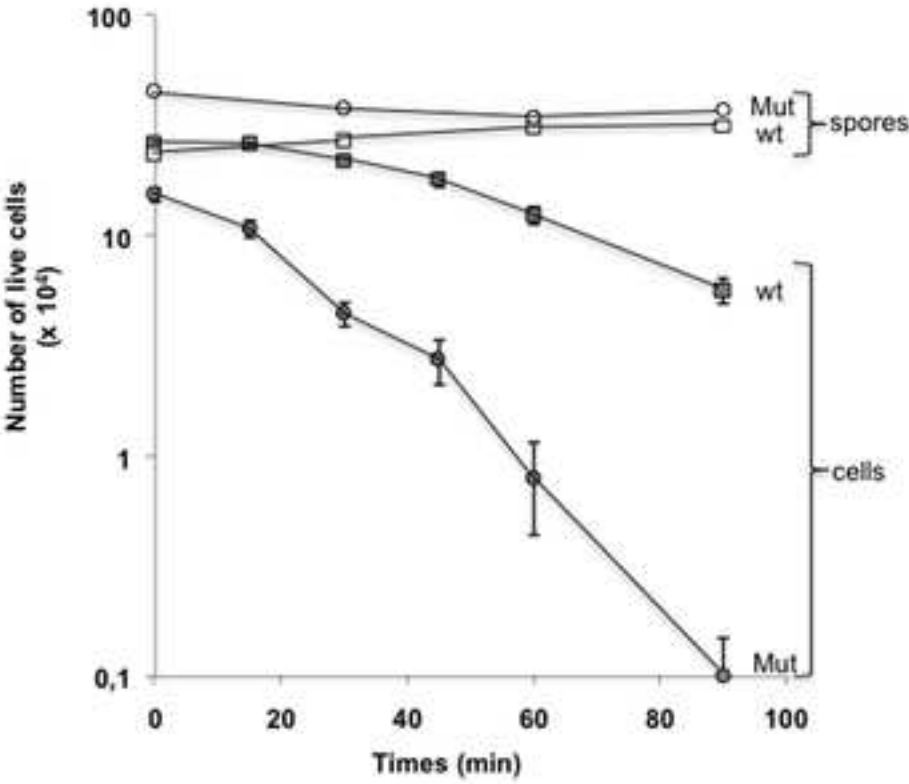


Fig. 7

Supporting Information 1

[Click here to download Supporting Information: Sup Mat 1.tif](#)

Supporting Information 2

[Click here to download Supporting Information: Sup Mat 2.tif](#)

Supporting Information 3

[Click here to download Supporting Information: Sup Mat 3.tif](#)

Supporting Information 4

[Click here to download Supporting Information: Sup Mat 4.tif](#)

Supporting Information 5

[Click here to download Supporting Information: Sup Mat 5.tif](#)

CAPITOLO 3

Il batterio probiotico
Lactobacillus gasseri SF1183
influenza la e crescita la sopravvivenza delle cellule epiteliali
intestinale

3.1 Introduzione

Diversi studi recenti hanno dimostrato che i batteri commensali, che compongono il microbiota intestinale umano, creano complesse interazioni simbiotiche con le cellule del tratto gastrointestinale (GIT) e che tali interazioni contribuiscono in modo significativo alla salute umana [1,2,3,4]. Esperimenti di Metagenomica hanno indicato che la maggior parte dei batteri intestinali appartiene a due phyla, i batteri Gram-negativi Bacteroidetes e Gram-positivi Firmicutes, compresi la grande classe di Clostridia e dei **batteri lattici** [5,6]. Tuttavia, è noto che la composizione della flora intestinale può cambiare temporaneamente come conseguenza di una varietà di fattori come l'età, la dieta, infezioni enteriche, trattamenti farmacologici e immunosoppressione [7,8,9]. Cambiamenti nella composizione del microbiota sono stati associati a varie malattie, come infiammazione cronica del tratto gastrointestinale (GIT), diabete e obesità [7,10,11,12,13,14], e la somministrazione orale dei membri del microbiota è stato considerato come un potenziale strumento clinico per alleviare disfunzioni intestinali [15,16,17,18,19,20]. L'Interesse, cresciuto negli anni, per le funzioni benefiche del microbiota umano ha portato alla selezione di ceppi specifici putativi con capacità di promozione della salute che sono riconosciuti come probiotici e sono generalmente scelti tra isolati di specie di *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. I batteri probiotici si sono dimostrati in grado di modulare l'infiammazione sistemica, la proliferazione cellulare e l'apoptosi, e tali proprietà sono proposte per l'uso futuro di strategie

immunomodulante e di prevenzione del cancro [13,14,21,22]. Studi in vitro effettuati hanno dimostrato gli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. in varie linee cellulari tumorali [23,24,25,26], mentre in vivo diversi studi hanno mostrato l'attività inibitrice dei probiotici sui tumori del fegato, della vescica e del colon in modelli animali [27,28,29,30].

I meccanismi molecolari di interazione tra cellule intestinali e batteri sono stati studiati in dettaglio solo in pochi casi e spesso processi di quorum-sensing e quindi processi di comunicazione dovuti a molecole rilasciate dai batteri a densità elevata, hanno dimostrato di modulare risposte dell'ospite direttamente o tramite regolazione di geni batterici coinvolti nella colonizzazione [31,32]. Un esempio in questo contesto è il quorum-sensing del pentapeptide CSF (fattore di Competenza e sporulazione) di *Bacillus subtilis* che è acquisito da cellule Caco-2 attraverso il trasportatore di membrana OCTN2 (trasportatore cationico organico 2) e che contribuisce alla sopravvivenza delle cellule eucariotiche attraverso l'attivazione di alcuni pathway cellulari (p38 MAP chinasi e della proteina chinasi B/Akt) [33]. In altri casi gli effettori batterici secreti non sono stati identificati: molecole secrete da *Lactobacillus rhamnosus* GG non ancora identificate è stato dimostrato che sono in grado di prevenire l'apoptosi indotta da citochine su due sistemi diversi di cellule intestinali modello (YAMC colon topo adulto; HT29-carcinoma del colon umano) [34]; molecole secrete da *L.reuteri* hanno mostrato di potenziare l'apoptosi indotta

dal fattore di necrosi tumorale (TNF α) in cellule di leucemia mieloide. In quest'ultimo esempio le molecole di *L.reuteri* sono capaci: i) di sopprimere NF-kB inibendo la degradazione I κ B α ; ii) di down-regolare i geni la cui espressione è dipendente dal **Fattore Nucleare kB (NF-kB)** e i cui prodotti influenzano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare; iii) di promuovere apoptosi attraverso una maggiore attività delle **MAP chinasi** attività, tra cui la chinasi N-terminal di *c-Jun* e *p38 MAPK* [35].

Lactobacillus gasseri è una specie batterica gram-positiva caratterizzata da basso GC, nota per rappresentare una delle principali specie di *Lattobacillus* omofermentanti dell'intestino umano [36]. ***Lattobacillus gasseri* SF183** è un batterio lattico isolato da ileo umano. In particolare è stato isolato da una biopsia di un paziente volontario sottoposto a una endoscopia diagnostica che si effettua di routine quando ci sono casi sospetti di cancro colo rettale [36].

Lattobacillus gasseri SF183 è stato isolato e identificato a livello di specie insieme ad altri batteri (*L.mucosae*, *Bifidobacterium breve*), attraverso un processo di isolamento selettivo, al fine di ottenere ceppi batterici strettamente associati all'epitelio intestinale [36]. Queste specie erano state già trovate precedentemente in campioni intestinali, ma non era mai stata preventivata la possibilità che fossero le specie più abbondanti tra quelle associate al tessuto epiteliale dell'intestino. Le analisi fisiologiche dei ceppi isolati e quindi anche di *Lattobacillus gasseri* SF183 hanno indicato che essi sono in grado di produrre molecole con attività antimicrobica, crescere e formare biofilm in

condizioni di crescita tipiche dell'intestino dopo l'esposizione a condizioni tipiche dello stomaco. La stretta associazione di *Lactobacillus gasseri* SF183 con cellule epiteliali ileali è presumibilmente indicativa di una interazione diretta con le cellule ospiti. Per questa ragione e per l'assenza di citotossicità in vitro, questo batterio può essere proposto come potenziale ceppo probiotico per uso umano.

Questo studio indaga gli effetti di molecole prodotte e secrete da *L. gasseri* SF1183 sul colon-retto HCT116 cellule, sia a livello molecolare e cellulare. Poiché HCT116 cellule sono sensibili alle TNF α apoptosi indotta [37,38], abbiamo testato la loro risposta alla presenza di *L. gasseri* SF1183 supernatante. Inoltre, abbiamo esteso la nostra analisi agli effetti di altri induttori di apoptosi per valutare la specificità dell'effetto osservato.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Crescita dei batteri e preparazione dei mezzi di coltura.

Lactobacillus gasseri (SF1183) è stato coltivato in brodo MRS (Difco, Detroit, MI) per 24 ore a 37°C e la cultura diluita è stata utilizzata per inoculare terreno minimo MDM (Glucosio 10 g/L, Sodio acetato 5g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, MgSO₄ * 7H₂O 0.2 g/L, L-Alanina 0.10 g/L, L-Arginina 0.10 g/L, L-acido aspartico 0.20 g/L, L-Cisteina 0.20 g/L, L-Glutamina 0.20 g/L, L-Istidina 0.10 g/L, L-Isoleucina 0.10 g/L, L-Leucina 0.10 g/L, L-Lisina 0.10 g/L, L-

Metionina 0.10 g/L, L-Fenilalanina 0.10 g/L, L-Serina 0.10 g/L, L-Triptofano 0.10 g/L, L-Tirosina 0.10 g/L, L-Valina 0.10 g/L, Acido nicotinico 0.001 g/L, Acido pantotenico 0.001 g/L, Piridoxal 0.002 g/L, Riboflavina 0.001 g/L, Cianocobalamina 0.001 g/L, Adenina 0.01 g/L, Guanina 0.01 g/L, Uracile 0.01 g/L). Cellule di SF1183 sono state cresciute anaerobicamente per 48 ore a 37°C. La coltura è stata centrifugata (3000 rpm per 10 minuti a RT) e il supernatante (terreno condizionato, **CM**) è stato filtrato attraverso un filtro 0,22 µm sterile a basso legame proteico (Millex, Millipore, Bedford, MA). Sono stati preparati CM trattati con proteasi e nucleasi e frazionati nelle dimensioni (colonna spin cutoff 3-kDa; Centricon, Millipore). Prima del trattamento con tripsina (GIBCO) o proteinasi K (Invitrogen), o DNasi I, o RNasi A (Invitrogen) tutti utilizzati ad una concentrazione finale 100 µg/ml il pH del CM è stato neutralizzato con NaOH concentrato; il trattamento con gli enzimi elencati è stato effettuato per 60 min a 37°C. Dopo i trattamenti enzimatici il CM è stato acidificato a pH 4,0 con HCl concentrato e poi dializzato per rimuovere gli enzimi.

3.2.2 Colture cellulari e trattamento con CM batterico.

cellule HCT116 (ATCC CCL 247) derivate da un adenocarcinoma del colon scarsamente differenziato sono state coltivate in RPMI 1640 integrato con 10% siero fetale bovino e 1% di penicillina-streptomicina. Le cellule sono state coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Il CM batterico è stata

impiegato per il trattamento alla concentrazione del 20% v/v nel terreno di coltura completo. Dopo incubazione di 16 ore con CM (20% v/v), TNF-alfa 1 nM (Millipore) o cisplatino 30 uM (Sigma) è stato aggiunto e le cellule sono state raccolte dopo 8 ore o 24 ore di trattamento. Le cellule sono state lisate e gli estratti cellulari analizzati per Western blot e FACS, rispettivamente, come descritto di seguito.

3.2.3 Analisi di SDS-PAGE e Western-Blot.

Le cellule sono state raccolte in tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, sodio desossicolato 0,5%, e inibitori di proteasi) e le proteine totali estratte preparate come già descritto [48]. Brevemente, lisati cellulari sono stati incubati in ghiaccio per 40 minuti, e gli estratti sono stati centrifugati a 13.200 rpm per 15 minuti per rimuovere i detriti cellulari. La concentrazioni proteica è stata determinata tramite l'utilizzo del *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad). Dopo l'aggiunta di 2x Laemmli buffer (SIGMA), i campioni sono stati bolliti a 100°C per 5 minuti e risolti tramite gel di SDS-poliacrilammide (10% o 12%). Le proteine sono state trasferite su una membrana di polyvinylidenedifluoride (PVDF) (membrane Millipore) come descritto in [49]. Le membrane sono state trattate con buffer di latte al 5% w/v (5% w/v non grasso liofilizzato, 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,2% Tween 20) e incubate con anticorpi primari diluiti in

5% w/v latte o albumina serica bovina, per 2 ore a temperatura ambiente o per una notte a 4°C. Gli anticorpi primari utilizzati, sono stati **anti-rabbit PARP-1** (Cell Signaling), **anti-rabbit pErks 42/44** (Cell Signaling), **anti-rabbit p21** (Santa-Cruz Biotechnology), **anti-goat β -actina** (Santa-Cruz Biotechnology). I dati sono stati visualizzati mediante metodo di chemiluminescenza (ECL, GE-Healthcare) usando anticorpi secondari coniugati con HRP (Santa-Cruz Biotechnology) incubati 1 ora a temperatura ambiente, e analizzati mediante software [Quantity One® ChemiDoc TMXRS](#) del sistema (Bio-Rad).

3.2.4 Crescita cellulare e analisi di citometria di flusso

HCT116 sono state piastrate in capsule da 35 mm con una densità cellulare pari a $2,5 \times 10^5$ cellule/piastra. Per l'analisi della crescita cellulare, le cellule sono state coltivate in mezzo di crescita completo implementato o no con CM batterico concentrato al 20% v/v per 24 ore. Dopo il trattamento, le cellule sono state raccolte e contate in una camera di Burkner. Per l'analisi di citometria a flusso, abbiamo seguito il protocollo come descritto in [50]. In breve, le cellule sono state lavate due volte con PBS e raccolte con tripsina 0,05% in 0,15% Na₂EDTA. Le cellule sono state quindi centrifugate, lavate in PBS, fissate con etanolo ghiacciato 70%, e conservate per una notte a 4°C. Le cellule fissate sono state poi lavate in PBS e incubate con **ioduro di propidio** (50 µg/ml) e RNasi A (10 µg/ml) per 30 min a temperatura ambiente. L'acquisizione dei dati è stata effettuata utilizzando un [CyAn ADP](#)

Citofluorimetro (Beckman Coulter, Inc., Milano, Italia) e il software ad esso collegato.

3.2.5 Saggio MTS

Cellule HCT116 sono state coltivate ad una densità di $2,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto a fondo piatto in piastre da 6 pozzetti e implementate o non con CM (20% v/v) per 24 ore. Dopo il trattamento, **CellTiter 96 ® ACQUOSA One Solution Reagent** (Promega, Madison, WI) è stata aggiunta a ciascun pozzetto secondo le istruzioni del produttore. Dopo 30 minuti in coltura la vitalità cellulare è stata determinata misurando l'assorbanza a 490 nm usando uno spettro Multiskan (Thermo Electron Corporation).

3.3 Risultati e discussione

3.3.1 Il mezzo condizionato (CM) di L.gasseri SF1183 protegge le cellule HCT116 dall'apoptosi indotta dal TNF- α

Tra le caratteristiche più comuni di infiammazioni croniche intestinali, come il **Crohn e malattie del colon irritabile (IBDs)**, c'è l'aumento della produzione di citochine infiammatorie, apoptosi delle cellule epiteliali e infiltrazione di cellule immunitarie, che portano alla rottura dell'integrità epiteliale intestinale. Il TNF α è una delle citochine più abbondantemente prodotta in queste condizioni. Il TNF α è noto per essere in grado di regolare sia i processi di

segnalazione pro-apoptotici che i processi di segnalazione anti-apoptotici e determinare il destino cellulare controllando l'equilibrio tra le due vie [39]. Per studiare gli effetti di molecole secrete da *L. gasseri* sull'apoptosi indotta dal TNF α abbiamo usato le cellule umane di cancro del colon HCT116 sensibili al TNF α , come modello di cellule epiteliali intestinali [37]. Come marker di apoptosi abbiamo seguito la degradazione proteolitica di PARP-1, un regolatore del pathway BER (base excision repair) per la riparazione del DNA, essenziale per il mantenimento dell'integrità genomica e per la sopravvivenza in risposta agli insulti genotossici [40]. PARP-1 è nota per essere proteolizzata specificamente dalla caspasi 3 in due frammenti proteici durante l'esecuzione del programma apoptotico [41], un frammento di 24 kDa che rappresenta il dominio di legame DNA (DBD) e un frammento di 89 kDa che rappresenta il dominio catalitico.

Per impostare le condizioni sperimentali, le cellule HCT116 sono state incubate con TNF α 1nM a vari tempi e gli estratti cellulari sono stati analizzati mediante western blotting con anticorpi anti-PARP-1. Come mostrato in figura 3.1A, la quantità di proteolyzed PARP-1 aumenta con il tempo di esposizione al TNF α . Perciò abbiamo deciso di utilizzare 8 ore di trattamento con TNF α 1 nM per rilevare sia un'eventuale induzione, sia un'eventuale inibizione del taglio della PARP clivaggio, per tutti gli esperimenti effettuati con TNF- α .

Mezzo di coltura esausto (CM) di *L. gasseri* 1183 filtrato sterilmente è stato aggiunto (20% v/v) alle cellule HCT116. Dopo 16 ore, il TNF α è stato aggiunto alle cellule e dopo ulteriori 8 ore le cellule sono state raccolte.

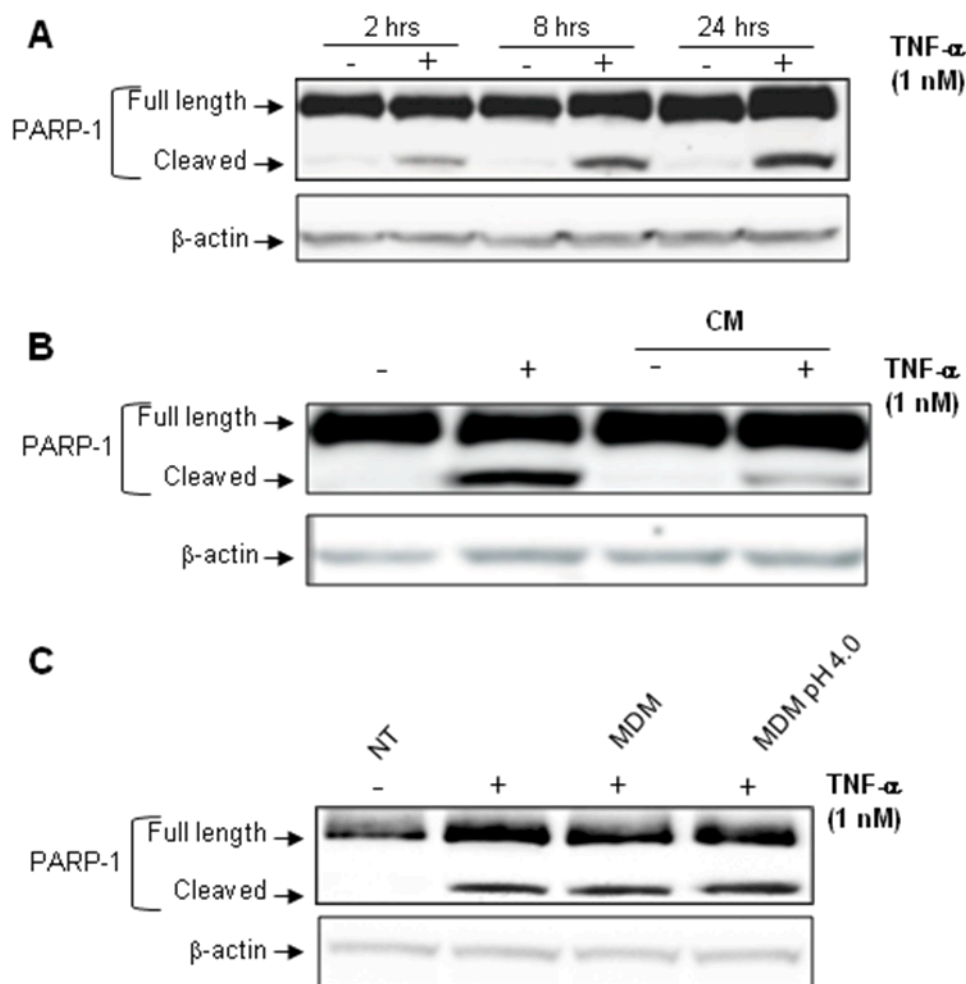


Fig 3.1. risposta cellulare delle HCT116 al CM di *L. gasseri* con o senza TNF α . Western blot con anticorpo anti-PARP-1 su estratti di cellule HCT116 incubate **(A)** in mezzo di coltura cellulare completo integrati o no con TNF α (1 nM) per 2, 8 o 24 ore; **(B)** mezzo completo di coltura cellulare integrati o non con CM (20% v / v) per 16 ore prima del trattamento con 1 nM TNF α per 8 ore, **(C)** mezzo completo di coltura cellulare implementato o no con TNF α (1 nM) per 8 ore e MDM (20% v / v) o MDM + acido lattico pH4 (20% v / v). Dopo che le cellule sono state raccolte, sono state lisate ed è stata determinata la concentrazione proteica. Pari quantità di lisati cellulari sono stati frazionati su SDS-PAGE e analizzati mediante Western blotting con anticorpi contro PARP-1. L'Actina è stata utilizzata come controllo di caricamento.

anticorpi anti-PARP-1 anticorpo. Come mostrato nella Figura 3.1B, il CM batterica, di per sé, non ha alcun effetto sul taglio della PARP-1, ma era in

grado di ridurre significativamente l'attivazione proteolitica di PARP-1 indotta del TNF α .

L. gasseri è un batterio omofermentante che, pertanto, producei acido lattico come cstsbolits finale nell'ambito del metabolismo dei carboidrati. Come conseguenza, il suo mezzo di crescita è acidificato durante la crescita fino a raggiungere valori finale di pH pari a 4,0. Per verificare che la riduzione della portata del taglio della PARP-1 era dovuta a molecole secrete e non alla acidificazione del mezzo di crescita, lo stesso esperimento di figura 3.1B è stato eseguito aggiungendo alle cellule HCT116 la stessa quantità (20% v/v) del mezzo di crescita batterica fresco (MDM, pH 7,0) e mezzo di crescita batterica fresco acidificata a pH 4,0 con acido lattico. Come mostrato in Fig. 3.1C, in entrambi i casi non si ha alcun effetto sul taglio proteolitico di PARP-1 indotto dal TNF α suggerendo che il CM di *L. gasseri* SF1183 contiene molecole con attività anti-apoptotica.

3.3.2 Il CM di L.gasseri SF1183 contiene molecola/e solubile bioattiva, secreta durante la fase stazionaria

Come primo passo verso la caratterizzazione di molecole coinvolte nell'effetto osservato, abbiamo deciso di separare per dimensione, le molecole presenti nel CM di *L. gasseri* utilizzando un filtro con cut-off di massa molecolare pari a 3 kDa. Nella figura 3.2A chiaramente abbiamo osservato come la bioattività

fosse ampiamente presente nel CM filtrato, indicando come molecola effettrice una molecola sicuramente di piccole dimensioni (meno di 3 kDa).

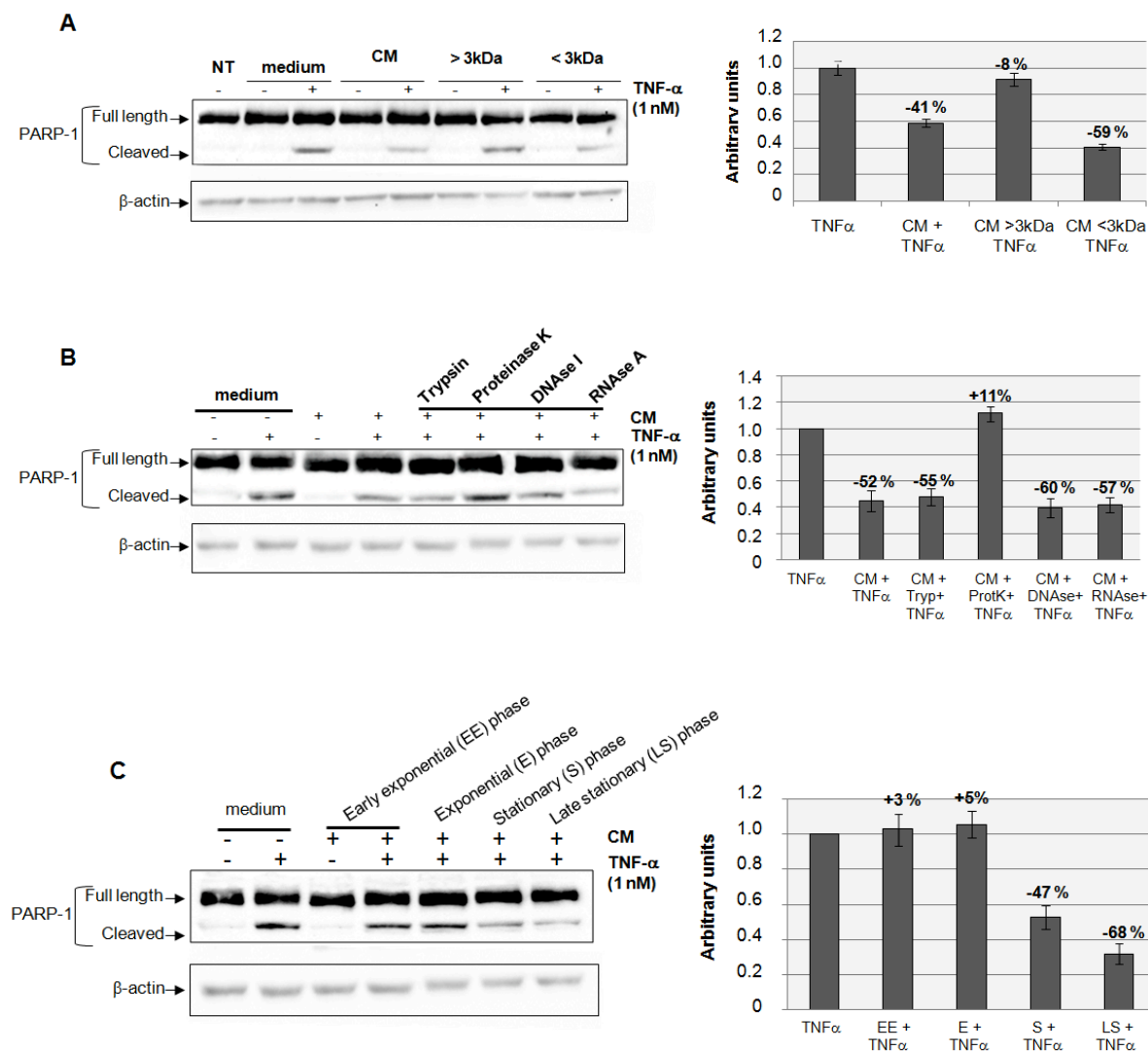


Fig. 3.2 :L. gasseri secerne bioattivo molecola solubile (s) di natura proteica durante la fase di crescita stazionaria. cellule HCT116 sono state incubate in mezzo completo di coltura cellulare integrati o no con TNFα (1 nM) per 8 ore e con **A)** CM frazionati con un cut-off di 3 kDa, o **B)** CM trattati con enzimi differenti [tripsina, proteinasi K, DNasi I, RNase A], o **C)** CM ottenuti a diverse fasi di crescita batterica. Dopo i trattamenti, le cellule sono state raccolte, lisate e gli estratti cellulari totali sono stati analizzati mediante Western blotting con anticorpi contro PARP-1. L'Actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. intensità della banda di PARP-1 è stata valutata mediante analisi ImageQuant su almeno due esposizioni diversi per assicurare la linearità di ogni acquisizione. Valori espressi come rapporto con i valori corrispondenti all'actina e normalizzati per il punto di riferimento. sono indicati anche la percentuale di aumento (+) o diminuzione (-) rispetto alla intensità del punto di riferimento

Inoltre, diversi trattamenti enzimatici del CM indicano che bioattività è **roteinasi K**-sensibile, suggerendo una natura proteica della molecola/e in questione (Figura 3.2B). Spesso i batteri secernono molecole bioattive durante la loro fase di crescita stazionaria. Abbiamo quindi testato il CM di *L.gasseri* ottenuto in diverse fasi di crescita e si osservava bioattività osservata solo in fase di crescita stazionaria precoce e tardiva (24 e 48 ore dopo la fine della crescita esponenziale, rispettivamente) (Figura 3.2C). Tutti gli esperimenti ivi riportati sono stati condotti utilizzando la CM-frazionata (> 3kDa) di una cultura in fase stazionaria tardiva di *L. gasseri* SF1183.

3.3.3 Il CM di L. gasseri SF1183 influenza la proliferazione cellulare delle cellule HCT116

Per caratterizzare la risposta cellulare al trattamento con CM di *L.gasseri*, abbiamo analizzato il numero di cellule e la vitalità cellulare delle cellule HCT116 dopo la crescita in presenza di CM. In breve, le cellule sono state incubate per 24 ore con CM di *L.gasseri* e senza CM e poi analizzati sia per il numero di cellule contando in una camera di Burker che per la vitalità cellulare mediante saggio MTS. Come mostra chiaramente la figura 3.3A, il CM ha causato una riduzione del 30% del numero di cellule. Il saggio MTS (Figura 3.3B) mostra una riduzione della vitalità cellulare dello stesso ordine di grandezza.

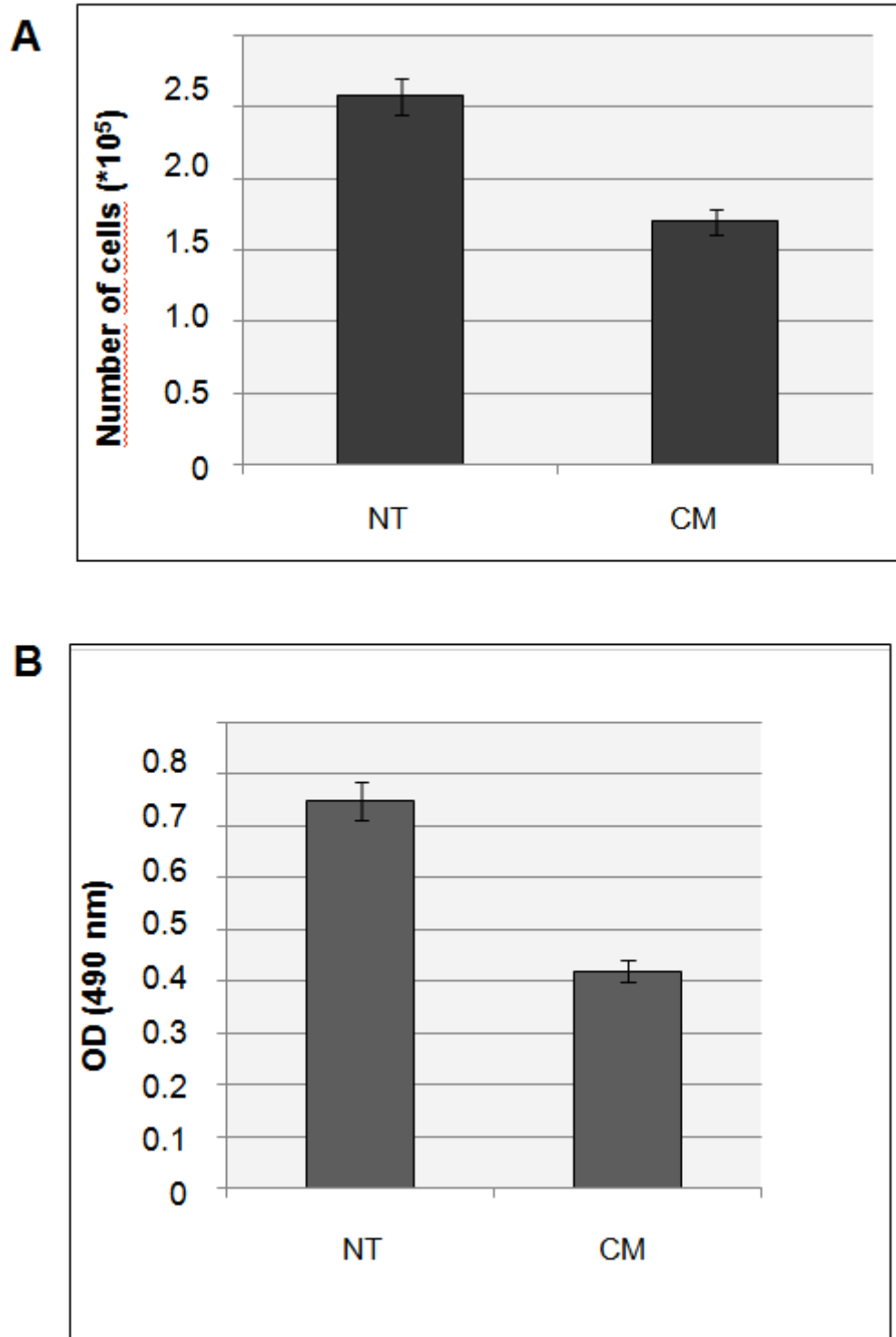


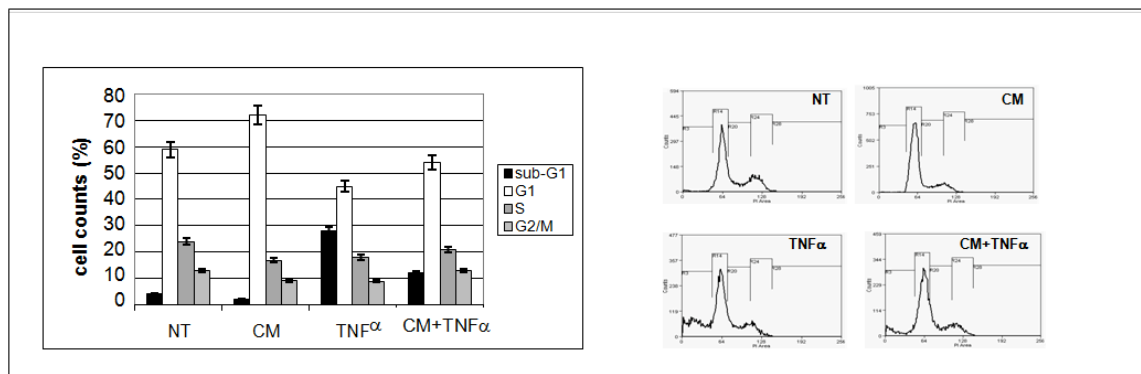
Fig. 3.3 : Il CM di *L. gasseri* SF1183 influenza il numero complessivo di cellule HCT116, ma non la vitalità cellulare. Cellule HCT116 Proliferanti sono state incubate in mezzo completo di coltura cellulare integrato o non con CM (20% v/v). Dopo 24 ore (**A**) le cellule di controllo (NT) e trattate con CM (CM) sono state raccolte e contate in una camera di Burkner, o (**B**) incubati con 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-solfofenil)-2H-tetrazolio come substrato e l'assorbanza del formazano convertito è stata misurata a 490nm.

Per cogliere le sfumature nella risposta cellulare, abbiamo deciso di guardare il profilo del ciclo cellulare di distribuzione e l'espressione di marcatori molecolari correlate al ciclo cellulare, per cellule HCT116 trattate con TNF α e pre-trattati o non pre-trattate con CM di *L.gasseri*.

La distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata mediante citometria di flusso e ha dimostrato che il trattamento con TNF α causa un drastico aumento della popolazione cellulare in fase **subG1** (da 4 a 28%), mentre il pre-trattamento delle cellule con il CM di *L. gasseri* riduce fortemente l'effetto indotto da TNF α (Figura 3.4A) sostenendo così i dati precedenti che indicavano una riduzione della portata del taglio di PARP-1 (vedere Figura 3.1B, 3.2B, 3.2C). Soprattutto, abbiamo trovato che da solo il CM causa un aumento significativo (fino al 18%) nella popolazione di cellule in fase **G1** con una riduzione compensativa delle cellule in fase **S/G2**, indicando che le cellule non erano in grado di riprendere il ciclo cellulare a velocità normale (Figura 3.4A), in coerenza con il saggio MTS e il saggio di proliferazione precedente. Ciò ci suggerisce che, le molecole secrete dalla *L. gasseri* possono drasticamente interferire con la proliferazione cellulare di cellule HCT116, rendendoli meno soggetti all'azione del TNF. Sono stati valutati anche gli effetti del CM di *L. gasseri* a livello molecolare, andando a verificare cosa accadeva a marvatori molecolari del ciclo cellulare come p21WAF. p21WAF1 (noto anche come inibitore della chinasi ciclina-dipendente 1) è un regolatore del ciclo cellulare nella fase S che agisce come un inibitore di chinasi ciclina-dipendente, e

occupa una posizione centrale nella regolazione del ciclo cellulare in molti tessuti [42,43].

A



B

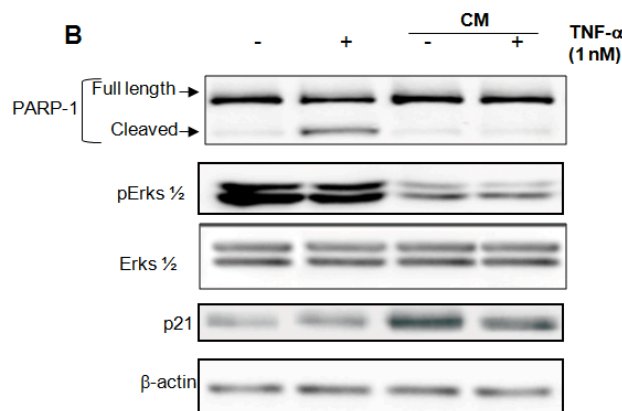


Fig. 3.4 : Il CM di *L. gasseri* SF1183 influenza la proliferazione cellulare di cellule HCT116. Cellule HCT116 proliferanti sono state incubate in mezzo completo di coltura cellulare integrati o non integrati con CM (20% v/v) e/o TNF α . Dopo i trattamenti, le cellule sono state raccolte e trattate per effettuare un'analisi di citometria a flusso (A) o western blot (B) con gli anticorpi indicati.

Livelli di proteina p21 sono regolate durante il ciclo cellulare a livello di trascrizione e di degradazione delle proteine, anche se restano ancora molte domande sul meccanismo di proteolisi di p21 [44,45]. ERK1,2 (extracellular signal-regulated kinases) sono membri della super famiglia delle MAP-Kinases che può mediare la proliferazione cellulare e l'apoptosi. ERK Attivate

(fosforilata), sono di solito associate alla proliferazione cellulare attiva [46], mentre p21 correla con un aumento di arresto del ciclo cellulare G1 [47]. Un immunoblot con gli anticorpi appropriati ha dimostrato che il trattamento con CM induce significativamente p21WAF indipendentemente dal TNF (Figura 3.4B; confrontare corsie 1-2 con 3-4), mentre l'espressione di pErks è inibita dalla presenza del sopranatante di *L. gasseri*, fortemente supportato dall'effetto anti-proliferativo delle molecole presenti nel CM di *L.gasseri*.

Nell'insieme questi esperimenti indicano chiaramente che il supernatante di *L. gasseri* esercita un effetto citostatico ma non citotossico sulle cellule epiteliali del colon.

3.3.4 Il CM di L. gasseri SF1183 protegge le cellule HCT116 dall'apoptosi indotta dal cis-platino

Al fine di verificare se molecole bioattive presenti nel supernatante di *L.gasseri* fossero in grado di esercitare effetti anti-apoptotici contro altri induttori di apoptosi, le cellule HCT116 sono state preincubate sia con CM che senza CM e poi trattati o meno con 30 μ M di cisplatino per indurre la via intrinseca dell'apoptosi. Come mostra la Figura 3.5B, il pretrattamento delle cellule con CM riduce il grado di apoptosi, come si vede dall'analisi del taglio PARP-1. Inoltre, in accordo a quanto osservato con il TNF α , l'incubazione con CM provoca un aumento dei livelli di p21 e una diminuzione di attivazione delle ERK (vedi anche Figura 3.4B). L'analisi citofluorimetrica conferma che, in

effetti, un arresto del ciclo cellulare G1 è indotto dall'aggiunta del CM che porta le cellule ad essere più resistenti alla apoptosi indotta da cisplatino (Figura 3.5A).

Complessivamente nostri risultati indicano chiaramente che il batterio probiotico *L.gasseri* protegge le cellule epiteliali intestinali dall'apoptosi indotta da citochine infiammatorie o farmaci citotossici, provocando l'arresto del ciclo cellulare.

A

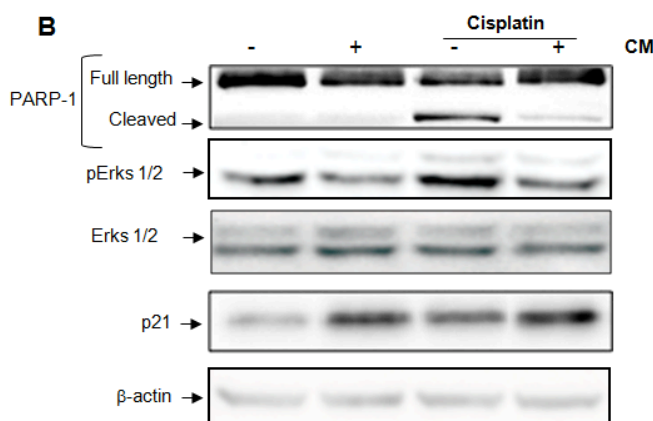
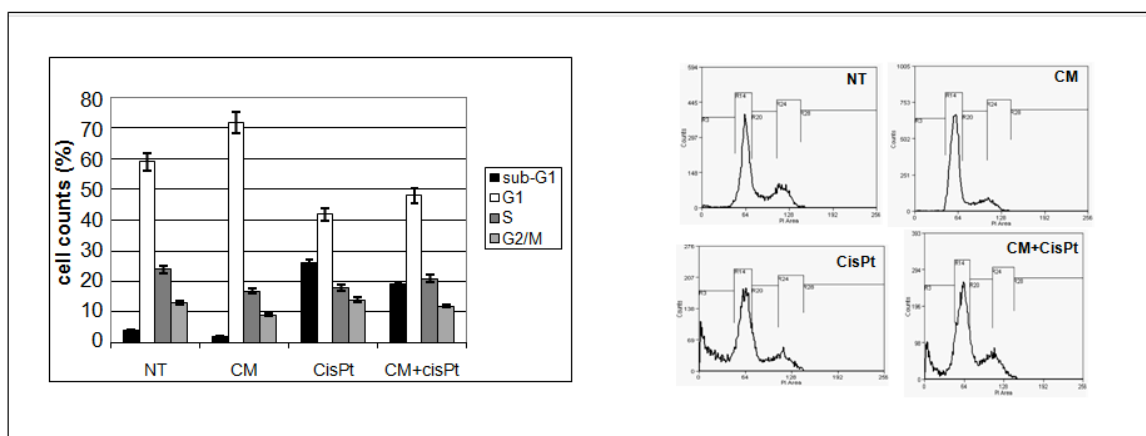


Fig. 3.5 : L'effetto anti-apoptotico di *L. gasseri* non è specifico per l'apoptosi indotta dal $\text{TNF}\alpha$. Cellule HCT116 proliferanti sono state incubate in mezzo completo di coltura cellulare integrati o non integrati con CM (20% v/v) e/o cisplatino (30 μM). Dopo i trattamenti, le cellule sono state raccolte e trattate per analisi di citometria a flusso (**A**) o western blot (**B**) con gli anticorpi indicati.

3.4 Conclusioni

Il risultato principale di questo lavoro è che il CM di una cultura in fase stazionaria di un isolato umano di *L. gasseri* (ceppo SF1183) contiene una molecola in grado di influenzare la proliferazione cellulare di cellule HCT116, proteggendole sia da apoptosi intrinseca che da apoptosi estrinseca (indotta dal TNF α). Le infiammazioni croniche causano un aumento delle citochine infiammatorie (come il TNF α), l'apoptosi delle cellule epiteliali e infiltrazione di cellule immunitarie, che portano alla distruzione dell'integrità epiteliale intestinale. Di conseguenza, una riduzione della proliferazione cellulare potrebbe proteggere l'integrità della barriera epiteliale e aiutare a ricostituire l'omeostasi tissutale.

La molecola *L. gasseri* responsabile degli effetti osservati è proteica, di piccole (meno di 3 kDa) dimensioni e la sua sintesi è dipendente dalla fase crescita, infatti essa si verifica solo in cellule batteriche in fase stazionaria. Tali proprietà sono tipiche molecole di comunicazione, prodotte a elevata densità cellulari e note per agire come modulatori delle risposte batteriche all'ospite (quorum-sensing) [31,32,33]. Purtroppo, l'identificazione della natura chimica della molecola secreta da *L. gasseri* SF1183 e in grado di influenzare le cellule HCT116 non è finora riuscita. Il CM frazionato (meno di 3 kDa) di *L. gasseri* è stato analizzato mediante cromatografia per gel filtrazione con una colonna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) e sono stati ottenuti due picchi principali (Fig 3.6) . Il taglio di PARP-1 indotto dal TNF- α

(Fig 3.7) delle due frazioni cromatografiche contenenti uno dei due picchi sono stati testati per la capacità di ridurre il taglio di PARP-1 nella stessa misura del CM non frazionato (Fig3.7). Solo una delle frazioni (Frazione 1) ha dimostrato una riduzione. Purtroppo, i tentativi di analizzare la Frazione 1 tramite spettrometria di massa sono finora fallite, probabilmente a causa della concentrazione minima di molecola nella frazione. Sarà quindi un compito impegnativo futuro definire la natura chimica della molecola che colpisce le cellule HCT116 e identificare i suoi bersagli cellulari e molecolari.

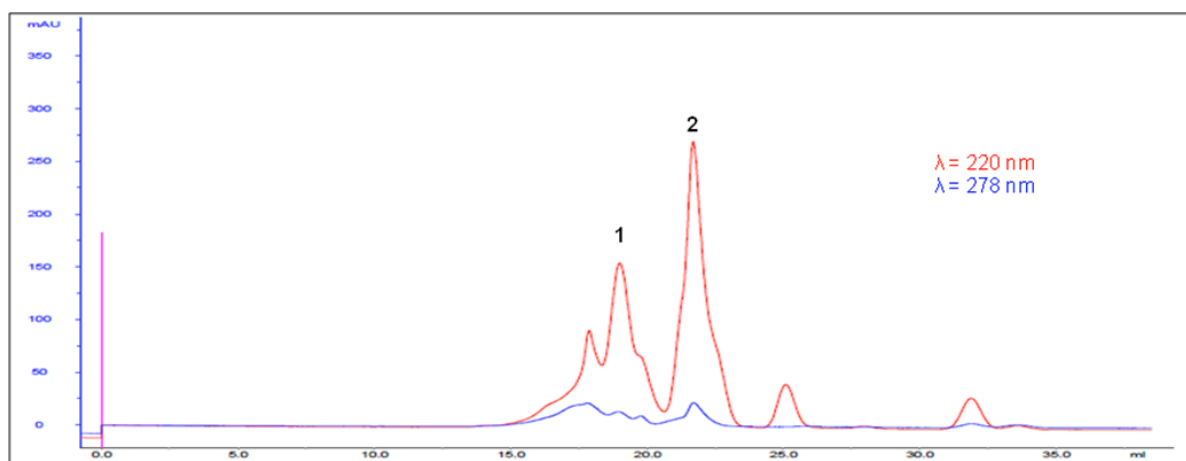


Fig. 3.6 : Il CM di *L.gasseri* è stato frazionato con un cut-off di massa molecolare da 3kDa e caricato su una colonna cromatografica di gel filtrazione (Superdex Peptide 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences). Il tampone di eluizione è stato AMAC 0,3 M. Due picchi principali sono stati osservati a 220 nm

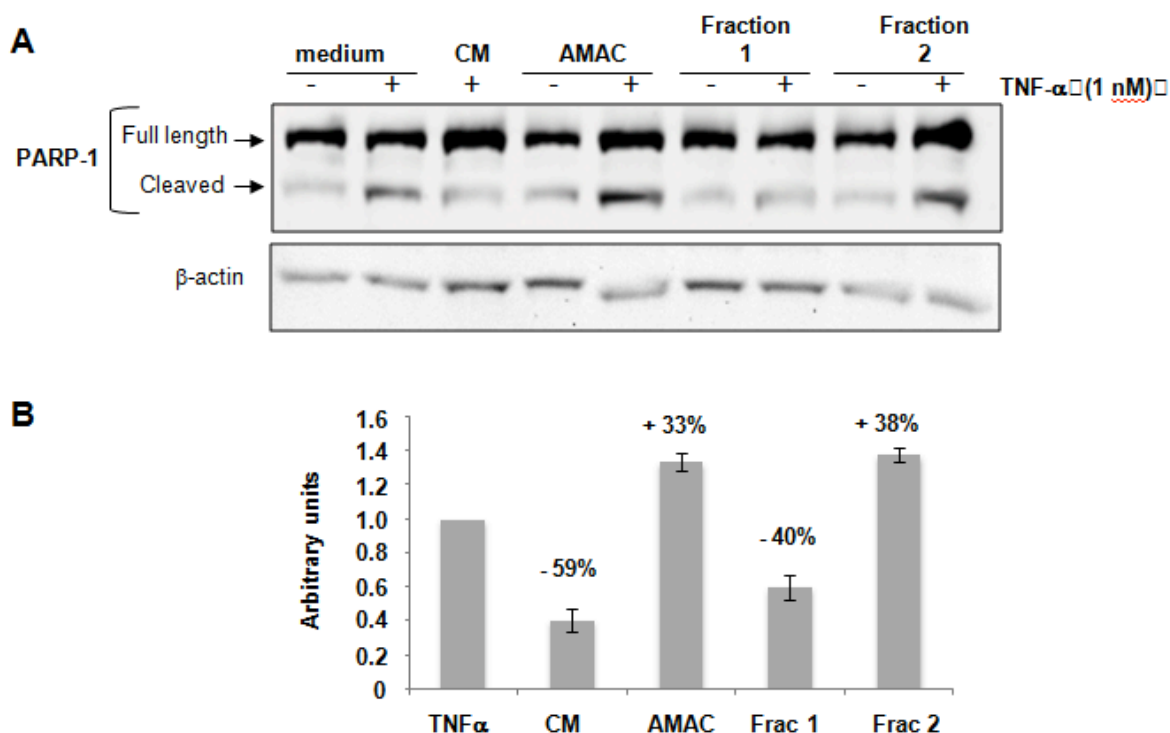


Fig. 3.7 : Frazioni cromatografiche dall'esperimento di Fig. 3.6 sono stati testati mediante Western blotting con anticorpi anti PARP-1 (**A**). Come controllo, le cellule sono state trattate anche con il tampone di eluizione (AMAC 0,3 M). (**B**) L'analisi densitometrica del Western blot.

intensità della banda di PARP-1 è stata valutata mediante analisi ImageQuant su almeno due esposizioni diverse per assicurare la linearità di ogni acquisizione. I valori sono espressi come rapporto con i corrispondenti valori di actina e normalizzati per il punto di riferimento. Percentuale di aumento (+) o diminuzione (-) rispetto alla intensità del punto di riferimento sono indicati.

4.5 Bibliografia

1. Macpherson AJ and Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4: 478-485.
2. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* Sep 13: 489(7415):220-30.
3. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. Mar 16;148(6):1258-70.
4. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI (2011) Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474:327-336.
5. Eckburg, PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638.
6. Mahowald, MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, et al. (2009) Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 5859-5864.
7. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A et al. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. Jan 22;457(7228):480-484.
8. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB et al. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(33):14691-6)
9. Biagi E, Candela M, Franceschi C, Brigidi P. (2011) The aging gut microbiota: new perspectives. *Ageing Res Rev.* Sep;10(4):428-9.
10. Wen L, Ley RE, Yu P, Volchkov PY, Stranges PB et al. (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455:1109,

11. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, et al. (2008) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (6): 2117-2122.
12. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M et al. (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA*;106:2365–2370.
13. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Shanahan F, Quigley EM. (2005) *Lactobacillus* and *bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*; 128:541-51.
14. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG et al. (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (43): 16731-16736;
15. Gilliland, SE, Nelson CR, Maxwell C (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* *Appl Environ Microbiol* 49: 377–381.
16. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault, MC, Cummings JH, Franck A, et al. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80 (Suppl 1): S147–S171.
17. Perdigon G, Fuller R, Raya, R (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol* 2: 27–42.
18. Rafter, J (2003) Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 849–859.
19. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004) Microbial–gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 299–313.

20. Guarner F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Gill HS, McGuirk P et al. (2006) Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 275–284.
21. Kato I, Endo-Tanaka, K, Yokokura T. (1998) Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Life Sci* 63: 635–644.
22. Sheil B, McCarthy J, O’Mahony L, Bennett MW, Ryan P et al. (2004) Is the mucosal route of administration essential for probiotic function ? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 53: 694–700.
23. Fichera GA, Giese G (1994) Non-immunologically mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cancer Lett* 85:93–103.
24. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G. (1997) Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer* 28:93–99.
25. Kim JY, Woo, HJ, Kim YS, Lee JH (2002) Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. *Biotechnol Lett* 24: 1431–1436.
26. Orlando A, Refolo MG, Messa C, Amati L, Lavermicocca P et al. (2012) Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutr Cancer*.;64(7):1103-11.
27. Reddy BS, Rivenson A (1993) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res* 53: 3914–3918.

28. Lim, BK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH (2002) Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. *Jpn J Cancer Res* 93: 36–41.
29. Candela M, Guidotti M, Fabbri A, Brigidi P, Franceschi C et al. (2011) Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit Rev Microbiol.* Feb;37(1):1-14.
30. Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H, Benno Y. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One.* 2011;6(8):e23652.
31. Sperandio V, Torres AG, Kaper JB (2002) Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 43:809, 2002.
32. Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W (2003) Mutation in *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 71:1972-1979.
33. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J et al. (2007) The *Bacillus subtilis* Quorum-Sensing Molecule CSF Contributes to Intestinal Homeostasis via OCTN2, a Host Cell Membrane Transporter. *Cell Host & Microbe* 1, 299–308.
34. Yan F, Polk DB (2002) Probiotic Bacterium Prevents Cytokine-induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem*, 277:50959-65
35. Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB et al (2008) Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signalling. *Cellular Microbiology* 10(7), 1442–1452

36. Fakhry S, Manzo N, D'Apuzzo E, Pietrini L, Sorrentini, I, et al. (2009). Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res. Microbiol.* 160:817-823
37. Zwacka M R, Stark L, Dunlop MG (2000) NF- κ B kinetics predetermine TNF α sensitivity of colorectal cancer cells. *J Gene Med* 2: 334-343.
38. Roemer M M, Roemer K (2001) p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* 20: 3387-3398.
39. Yan F, John SK and Polk DB (2001) Kinase suppressor of Ras determines survival of intestinal epithelial cells exposed to tumor necrosis factor *Cancer Res* 61, 8668-8675
40. D'Amours D, Sallmann FR, Vishva MD, Poiriers GG (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114, 3771-3778
41. Kaufmann, SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985.
42. Sherr, CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, 13 pp. 1501–1512
43. Weinberg WC, Denning MF (2002) p21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med*;13(6):453-64.
44. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M (2003) Proteasome-Mediated Degradation of p21 via N-Terminal Ubiquitinylation *Cell*, Vol. 115, 71–82.
45. Pollice A, Vivo M, La Mantia G (2008) The promiscuity of ARF interactions with the proteasome. *FEBS Letters* 582:3257–3262
46. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH et al (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK

- pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (8): 1263–84
47. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R et al. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817±825.
48. Vivo M, Di Costanzo A, Fortugno P, Pollice A, Calabrò V et al. (2009) Downregulation of $\Delta Np63\alpha$ in keratinocytes by p14ARF-mediated SUMO-conjugation and degradation. *Cell Cycle* 8:21, 3545-3551.
49. Vivo M, Ranieri M, Sansone F, Santoriello C, Calogero RA et al Mimicking p14ARF Phosphorylation Influences Its Ability to Restrain Cell Proliferation. *PLoS One*. 2013;8(1):e53631. doi: 10.1371/journal.pone.0053631. Epub 2013 Jan 7
50. Di Luccia B, Manzo N, Vivo M, Galano E, Amoresano A et al. (2013) A Biochemical and Cellular Approach to Explore the Antiproliferative and Prodifferentiative Activity of Aloe Arborescens Leaf Extract *Phytother Res*. 2013 Feb 17. doi: 10.1002/ptr.4939. [Epub ahead of print

Allegato 3

(Lavoro recentemente sottomesso)

***Lactobacillus gasseri* SF1183 affects intestinal epithelial cell survival and growth.**

Blanda Di Luccia^{¶1}, Nicola Manzo^{¶1}, Loredana Baccigalupi¹, Viola Calabrò¹,
Elvira Crescenzi², Ezio Ricca¹, Alessandra Pollice^{*1}

¹Department of Biology, University of Naples Federico II-MSA-Via Cinthia 26-80126 Naples, Italy

²Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale-CNR-via S. Pansini, 5- 80131 Naples, Italy.

Key words: Probiotics, Lactobacillus gasseri, intestinal epithelial cells

Running Title: Effects of probiotic L.gasseri on intestinal epithelial cells.

[¶] These two authors equally contributed to the work.

* Corresponding Author: Alessandra Pollice Dipartimento di Biologia, Università di Napoli "Federico II", 80126 Naples, Italy.
Tel: +39 081 679068 Email: apollice@unina.it

Abstract

It is now commonly accepted that the intestinal microbiota plays a crucial role in the gut physiology and homeostasis, and that both qualitative and quantitative alterations in the compositions of the gut flora exert profound effects on the host's intestinal cells. In spite of this, the details of the interaction between commensal bacteria and intestinal cells are still largely unknown and only in few cases the molecular mechanisms have been elucidated. Here we analyze the effects of molecules produced and secreted by *Lactobacillus gasseri* SF1183 on human intestinal HCT116 cells. *L. gasseri* is a well known species of lactic acid bacteria, commonly associated to the human intestine and SF1183 is a human strain previously isolated from an ileal biopsy of an healthy volunteer. SF1183 produces and secretes, in a growth phase-dependent way, molecule(s) able to drastically interfere with HCT116 cell proliferation. *L. gasseri* molecule(s) stimulate a G1-phase arrest of the cell cycle by up-regulation of p21WAF1 rendering cells protected from intrinsic and extrinsic apoptosis.

Introduction

Several recent studies have shown that commensal bacteria, forming the human gut microbiota, establish complex symbiotic interactions with cells of the gastrointestinal tract (GIT) and that these interactions significantly contribute to human health [1,2,3,4]. Metagenomic experiments have indicated that the vast majority of the intestinal bacteria belong to two phyla, the Gram-negative Bacteroidetes and the Gram-positive Firmicutes, including the large class of Clostridia and the lactic acid bacteria [5,6]. However, the composition of the gut microbiota is known to change transiently as a consequence of a variety of factors such as age, diet, enteral infections, pharmacological treatments and immunosuppression [7,8,9]. Changes in the microbiota composition have also been associated to several diseases, such as chronic inflammation of the Gastro-Intestinal tract (GIT), diabetes and obesity [7,10,11,12,13,14], and the oral administration of members of the microbiota has been considered as a potential clinical tool to relieve intestinal dysfunctions [15,16,17,18,19,20]. Interest in the beneficial functions of the human microbiota has resulted in the selection of specific strains with putative health-promoting capacities that are recognized as probiotics and are generally selected from isolates of the *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* species. Probiotic bacteria have been shown capable to modulate systemic inflammation, cell proliferation and apoptosis, and such properties proposed as useful for future immunomodulatory and cancer prevention strategies [13,14,21,22]. *In vitro* studies have reported the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. in various cancer cell lines [23,24,25,26], while *in vivo* studies have shown the inhibitory activity of probiotics on liver, bladder and colon tumours in animal models [27,28,29,30].

The molecular mechanisms of interaction between intestinal cells and bacteria have been studied in detail only in few cases and often quorum-sensing autoinducers, communication molecules released by bacteria at high densities, have been shown to modulate host responses either directly or through regulation of bacterial genes involved in gut colonization and host signalling [31,32]. An example in this context is the quorum-sensing pentapeptide

CSF (Competence and Sporulation Factor) of *Bacillus subtilis* that is taken up by Caco-2 cells via the membrane transporter OCTN2 (organic cation transporter 2) and that contributes to eukaryotic cell homeostasis activating survival pathways (p38 MAP kinase and protein kinase B/ Akt) [33]. In other cases the secreted bacterial effectors have not been identified: still unidentified molecules secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG were shown to prevent cytokine-induced apoptosis on two different intestinal cell model systems (YAMC-young adult mouse colon; HT29-colon carcinoma) [34]; molecules secreted by *L. reuteri* were shown to potentiate tumour necrosis factor (TNF α)-induced apoptosis in myeloid leukemia derived cells. In the latter example *L. reuteri* molecules were found to: i) suppress NF-kB activation by inhibiting I κ B α degradation; ii) downregulate nuclear factor-kB (NF-kB)-dependent gene products affecting cell proliferation and survival; iii) promote apoptosis by enhancing mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities including c-Jun N-terminal kinase and p38 MAPK [35].

Lactobacillus gasseri is a well characterized species of low GC gram-positive bacteria, known to represent one of the major homofermentative *Lactobacillus* of the human intestine [36]. We have isolated the SF1183 strain of *L. gasseri* from an ileal biopsy of a human healthy volunteer and, in particular, from the fraction of bacteria tightly associated to the epithelial cells. SF1183 was shown to have antimicrobial activity against a panel of enteropathogens and to form a matrix (biofilm) in standard laboratory as well as in simulated intestinal conditions [36].

This study investigates the effects of molecules produced and secreted by *L. gasseri* SF1183 on colorectal HCT116 cells, both at the molecular and cellular level. Since HCT116 cells are responsive to TNF α -induced apoptosis [37,38], we tested their response to the presence of *L. gasseri* SF1183 supernatant. Moreover, we extended our analysis to the effects of another inducer of apoptosis to evaluate the specificity of the observed effect.

Results and Discussion

The conditioned medium (CM) of *L. gasseri* SF1183 protects HCT116 cells from TNF α induced apoptosis

Among the most common features of chronic intestinal inflammations, such as Crohn and irritable bowel diseases (IBDs), is the increase in the production of inflammatory cytokines, epithelial cell apoptosis and immune cell infiltration, leading to disruption of the intestinal epithelial integrity. TNF α is among the cytokines more largely produced under these conditions. It is known to regulate both anti- and pro-apoptotic signaling pathways and determine the cell fate by controlling the balance between the two pathways [39]. To study the effects of molecules secreted by *L. gasseri* on TNF α -induced apoptosis we used the TNF α sensitive HCT116 human colon cancer cells as a model of intestinal epithelial cells [37]. As a marker of apoptosis we followed the proteolytic cleavage of PARP-1, a regulator of the DNA base excision repair pathway essential for the maintenance of genomic integrity and for survival in response to genotoxic insults [40]. PARP-1 is known to be specifically proteolysed by the Caspase 3 to a 24 kDa DNA-binding domain (DBD) and a 89 kDa catalytic fragment during the execution of the apoptotic program [41]. To set up the experimental conditions, HCT116 cells were incubated with 1 nM TNF α for various times and cell extracts analyzed by western blotting with anti-PARP-1 antibody. As shown in Figure 1A, the amount of proteolyzed PARP-1 increased with the time of exposure to TNF α . Therefore we decided to use 8 hours of treatment with 1 nM TNF α to detect either induction or inhibition of PARP cleavage, for all therein experiments involving a TNF- α activation.

A filter-sterilized conditioned medium (CM) of a *L. gasseri* SF1183 culture was added (20% v/v) to HCT116 cells and incubated for 16 hours. Then, TNF α was added and, after additional 8 hours of incubation, cells were harvested and whole extracts analyzed by western blotting with anti-PARP-1 antibody. As shown in Figure 1B the bacterial CM alone did not have any effect on PARP-1 cleavage while was able to significantly reduce the TNF α -induced proteolytic activation of PARP-1.

L. gasseri is a homofermentative bacterium that, therefore, grows producing lactic acid as the only metabolic end-point of carbohydrate metabolism. As a consequence, its growth medium is acidified during growth to reach a final pH value of 4.0. To verify that the reduction in the extent of PARP-1 cleavage was due to secreted molecules and not to the acidification of the growth medium, the same experiment of Figure 1B was performed adding to HCT116 cells the same amount (20% v/v) of the fresh bacterial growth medium (MDM) either at its normal pH (pH 7.0) or acidified to pH 4.0 with lactic acid. As shown in Fig. 1C, both media did not have any effect on TNF α -induced cleavage of PARP-1 suggesting that the CM of *L. gasseri* SF1183 contains molecules with anti-apoptotic activity.

The CM of *L. gasseri* SF1183 contains bioactive soluble molecule(s) secreted during the stationary phase of growth

As a first step toward the characterization of molecule(s) involved in the observed effect, we decided to size-separate the CM of *L. gasseri* by using a 3 kDa molecular mass cut-off filter. As Figure 2A clearly shows we observed bioactivity largely in the filtrate, indicating a small (less than 3 kDa) molecular mass for the effector(s) molecule(s). Further, different enzymatic treatments of the CM indicated that bioactivity is proteinase-K sensitive, suggesting a proteinaceous nature (Figure 2B). Often bacteria secrete bioactive molecules during their stationary phase of growth. We thus tested the CM of *L. gasseri* cultures at different stages of growth and observed bioactivity produced only in early and late stationary phase of growth (24 and 48 hours of growth, respectively) (Figure 2). All experiments therein reported have been performed by using the size-fractionated (< 3 kDa) CM of a late stationary culture of *L. gasseri* SF1183.

The CM of *L. gasseri* SF1183 affects cell proliferation of HCT116 cells

To characterize the cellular response to *L. gasseri* secreted molecules, we analyzed HCT116 cell number and viability after growth in presence of CM. Briefly, cells were incubated for 24 hours with CM of *L. gasseri* (20% vol/vol) and then analyzed both for the number of cells by

counting in a Burkholder chamber and for cell viability by MTS assay. As Figure 3A shows, the CM caused a 30% reduction in the number of cells. The MTS assay (Figure 3B) showed a reduction in cell viability of the same order of magnitude.

To get more insights into the cellular response, we looked at the cell-cycle distribution profile and at the expression of cell cycle-related molecular markers in HCT116 cells exposed to TNF α and/or to the CM of *L. gasseri*.

The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry and showed that treatment with TNF α causes a drastic increase in the subG1 cell population (from 4 to 28%) while the pre-treatment of cells with the CM of *L. gasseri* strongly reduced the TNF α induced effect (Figure 4A), thus supporting our previous data indicating a reduction in the extent of PARP-1 cleavage (see Figure 1B, 2B, 2C). Importantly, we found that the CM alone caused a significant increase (up to 18%) in the G1 population of cells with a compensatory decrease in S/G2 cells, indicating that cells were unable to resume the cell cycle at normal phase transit rate (Figure 4A), consistently with previous MTS and proliferation data. This suggests that, indeed, molecules secreted from *L. gasseri* can drastically interfere with proliferation of HCT116 cells, rendering them less prone to TNF α induced apoptosis.

Expression of the cell cycle markers p21WAF1 and pERKs was also investigated to explore the effects of the CM of *L. gasseri* at the molecular level. p21WAF1 (also known as cyclin-dependent kinase inhibitor 1) is a regulator of cell cycle progression at the S phase that acts as an inhibitor of cyclin-dependent kinase, and occupies a central position in the regulation of the cell cycle in many tissues [42,43]. Levels of p21WAF1 protein are regulated during the cell cycle at the levels of transcription and protein degradation, although many questions remain on the mechanism of p21 proteolysis [44,45]. ERK1,2 (Extracellular signal-regulated kinases) are members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) super family that can mediate cell proliferation and apoptosis. Activated (phosphorylated) ERKs, are usually associated with active cell proliferation [46], while p21 increase correlates with a G1 cell cycle arrest [47]. Immunoblots with the appropriate antibodies showed that treatment with CM significantly induced p21WAF independently from TNF α (Figure 4B; compare lanes 1-2

with 3-4) while pERKs expression was inhibited in CM treated cells, strongly supporting the antiproliferative effect of molecule(s) present in *L. gasseri* supernatant.

Altogether these experiments clearly indicate that *L. gasseri* supernatant exerts a cytostatic but not a cytotoxic effect on epithelial colon cells.

The CM of *L. gasseri* SF1183 protects HCT116 cells from cisplatin induced apoptosis

To test whether bioactive molecules present in *L. gasseri* supernatant could exert anti-apoptotic effects against other apoptosis-inducers we preincubated HCT116 cells with CM and then treated them with 30 μ M cisplatin to induce the intrinsic apoptotic pathway. As shown in Figure 5A cytofluorimetric analysis indicate that a G1 cell cycle arrest is induced by CM addition which causes cells to be more resistant to cisplatin induced apoptosis. These observations are supported, at the molecular level, with an increase in p21WAF1 levels and a decrease of ERKs activation when CM was added to the cells (Figure 5B, lanes 1,2). Consistently, pretreatment of cells with CM determined a reduction in the extent of PARP-1 cleavage when cells were subjected to cisplatin action (Figure 5B, lanes 3,4).

Altogether our results clearly indicate that probiotic *L. gasseri* protects intestinal epithelial cells from apoptosis induced by inflammatory cytokines or cytotoxic drugs, causing cell cycle arrest.

Conclusions

The main result of this report is that the conditioned medium of a stationary culture of the human isolate SF1183 of *L. gasseri* contains molecule(s) able to affect cell proliferation of HCT116 cells, protecting them from intrinsic as well as extrinsic, TNF α -induced, apoptosis. Chronic inflammations cause an increase in inflammatory cytokines (such as TNF α), epithelial cell apoptosis and immune cell infiltration, leading to disruption of the intestinal epithelial integrity. Therefore, a reduction of cell proliferation could protect epithelial barrier integrity and help in reconstituting tissutal homeostasis.

The *L. gasseri* molecule(s) responsible of the observed effects is proteinaceous, has a small (less than 3 kDa) size and its synthesis is growth phase-dependent, occurring only in bacterial cells in stationary phase. Those properties are suggestive of bacterial quorum-sensing autoinducers, communication molecules produced at high cell density and known to act as modulator of bacterial host responses [31,32,33]. Unfortunately, the definition of the chemical nature of the molecule(s) secreted by *L. gasseri* SF1183 and able to affect HCT116 cells has been so far unsuccessful. The size-fractionated (less than 3 kDa) CM of *L. gasseri* was analyzed by gel filtration chromatography with a Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) column and two main peaks were obtained (Suppl. Mat Fig. S1). Chromatographic fractions containing either one of the two peaks were tested for the ability to reduce the TNF α -induced cleavage of PARP-1 (Suppl. Mat Fig. S2A). Only one of the fractions (Fraction 1) was shown to reduce the TNF α -induced cleavage of PARP-1 at the same extent of the unfractionated CM (Suppl. Mat Fig. S2B). Unfortunately, attempts to analyze Fraction 1 by mass-spectrometry have been so far unsuccessful, probably because of the minimal concentration of molecules in the fraction. To define the chemical nature of the molecule(s) affecting HCT116 cells and identify its cellular and molecular targets will then be a future and challenging task.

Materials and Methods

Bacterial growth and preparation of conditioned medium

Lactobacillus gasseri (SF1183) was grown in MRS broth (Difco, Detroit, MI) for 24 hours at 37°C and the culture diluted and used to inoculate MDM (Glucose 10 g/L, Sodium acetate 5g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, MgSO₄ * 7H₂O 0.2 g/L, L-Alanine 0.10 g/L, L-Arginine 0.10 g/L, L-Aspartic acid 0.20 g/L, L-Cysteine 0.20 g/L, L-Glutamic 0.20 g/L, L-Histidine 0.10 g/L, L-Isoleucine 0.10 g/L, L-Leucine 0.10 g/L, L-Lysine 0.10 g/L, L-Methionine 0.10 g/L, L-Phenylalanine 0.10 g/L, L-Serine 0.10 g/L, L-Tryptophan 0.10 g/L, L-Tyrosine 0.10 g/L, L-Valine 0.10 g/L, Nicotinic acid 0.001 g/L, Pantothenic acid 0.001 g/L, Pyridoxal 0.002 g/L, Riboflavin 0.001 g/L, Cyanocobalamin 0.001 g/L, Adenine 0.01 g/L, Guanine 0.01 g/L, Uracil 0.01 g/L) minimal medium. Cells of SF1183 were then grown anaerobically for 48 hours at 37°C. The culture was centrifuged (3000 rpm for 10 min at RT) and the supernatant (conditioned medium, CM) was filtered-sterilized through a 0.22 µm low-protein binding filter (Millex; Millipore, Bedford, MA). CM treated with proteases and nucleases was prepared as described above and size fractionated (3-kDa cutoff spin column; Centricon, Millipore). Before treatment with trypsin (GIBCO) or proteinase K (Invitrogen), or DNase I, or RNase A (Invitrogen) at a final 100 µg/ml concentration for 60 min at 37°C the pH of CM was neutralized with concentrated NaOH (10 N). After the enzymatic treatments CM was acidified to pH 4.0 using concentrated HCl and fractionated as described above to remove the enzymes.

Cell culture and treatment with bacterial CM

HCT116 cells (ATCC CCL 247) derived from a poorly-differentiated colonic adenocarcinoma and were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. Cells were cultured at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂. The bacterial CM was employed for the treatment at 20% v/v concentration in complete growth medium. After incubation of 16 hours with CM (20% v/v), TNFα (1 nM, Millipore) or Cisplatin (30 µM, Sigma) was added and cells harvested after 8 hours or 24 hours of

treatment. Cells were lysed and cell extracts prepared for Western blot and FACS analysis, respectively, as described below.

SDS-PAGE and Western Immunoblot analysis

Cells were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% sodium deoxycholate, and protease inhibitors) and total protein extract prepared as previously described [48]. Briefly, cell lysates were incubated on ice for 40 minutes, and the extracts were centrifuged at 13200 rpm for 15 minutes to remove cell debris. Protein concentration was determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad). After the addition of 2x Laemmli buffer (SIGMA), samples were boiled at 100°C for 5 minutes and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% or 12%). Proteins were transferred to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes (Millipore) as previously described [49]. The membranes were blocked in 5% w/v milk buffer (5% w/v non-fat dried milk, 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0.2% Tween 20) and incubated with primary antibody diluted in 5% w/v milk or bovine serum albumine buffer for 2 hours at room temperature or overnight at 4°C. Primary antibodies were anti-rabbit PARP-1 (Cell Signalling), anti-rabbit pErks 42/44 (Cell Signalling), anti-rabbit p21WAF1 (Santa-Cruz Biotechnology), anti-goat β -actin (Santa-Cruz Biotechnology). Data were visualized by enhanced chemiluminescence method (ECL, GE-Healthcare) using HRP-conjugated secondary antibody (Santa-Cruz Biotechnology) incubated 1 hour at room temperature, and analysed by Quantity One ®software of ChemiDoc™XRS system (Bio-Rad).

Cell growth and flow cytometry analysis

HCT116 cells were plated in 35mm dishes at the cell density of 2.5×10^5 cells/plate. For cell growth analysis, cells were cultured in complete growth medium supplemented or not with bacterial CM at 20% v/v concentration for 24 hours. After the treatment, cells were collected and counted in a Burkert chamber. Flow cytometry analysis was performed as previously described [50]. Briefly, cells were washed twice with PBS and harvested with 0.05% trypsin

250 in 0.15% Na₂EDTA. Cells were then centrifuged, washed in PBS, fixed with ice-cold 70%
251 ethanol, and stored overnight at 4°C. Fixed cells were washed in PBS and then incubated
252 with propidium iodide (50 µg/ml) and RNase A (10 µg/ml) for 30 min at room temperature.
253 Data acquisition was performed using a CyAn ADP Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc.,
254 Milano, Italy) and Summit Software.

255

256 **MTS assay**

257 HCT116 cells were cultured at a density of 2,5x10⁵ cells per well in flat bottomed 6-well
258 plates and supplemented or not with CM (20% v/v) for 24 hours. After treatment, CellTiter
259 96® AQUEOUS One Solution Reagent (Promega, Madison, WI) was added to each well
260 according to the manufacturer's instructions. After 30 minutes cell viability was determined
261 by measuring the absorbance at 490nm using a Multiskan spectrum (Thermo Electron
262 Corporation).

263

264

265 **Acknowledgments**

266 We thank Elio Pizzo for helping us with the chromatography experiments and Luciano Di
267 Iorio for technical assistance.

268

References

1. Macpherson AJ, Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4: 478-485.
2. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 13: 489:220-230.
3. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148:1258-1270.
4. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI (2011) Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474:327-336.
5. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
6. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, et al. (2009) Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:5859-5864.
7. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A et al. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480-484.
8. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB et al. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14691-14696
9. Biagi E, Candela M, Franceschi C, Brigidi P. (2011) The aging gut microbiota: new perspectives. *Ageing Res Rev.* 10:428-439.
10. Wen L, Ley RE, Yu P, Volchkov PY, Stranges PB et al. (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455:1109-1113.
11. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, et al. (2008) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2117-2122.

12. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M et al. (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2365–2370.
13. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Shanahan F, Quigley EM. (2005) *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterol.* 128:541-551.
14. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG et al. (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16731-16736.
15. Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* *Appl Environ Microbiol* 49: 377–381.
16. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault, MC, Cummings JH, Franck A, et al. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80: S147–S171.
17. Perdigon G, Fuller R, Raya, R (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol* 2: 27–42.
18. Rafter J (2003) Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 849–859.
19. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004) Microbial–gut interactions in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 299–313.
20. Guarner F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Gill HS, McGuirk P et al. (2006) Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 275–284.
21. Kato I, Endo-Tanaka, K, Yokokura T. (1998) Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Life Sci* 63:635–644.
22. Sheil B, McCarthy J, O'Mahony L, Bennett MW, Ryan P et al. (2004) Is the mucosal

- route of administration essential for probiotic function ? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 53: 694–700.
23. Fichera GA, Giese G (1994) Non-immunologically mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cancer Lett* 85:93–103.
24. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G. (1997) Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer* 28:93–99.
25. Kim JY, Woo, HJ, Kim YS, Lee JH (2002) Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. *Biotechnol Lett* 24: 1431–1436.
26. Orlando A, Refolo MG, Messa C, Amati L, Lavermicocca P et al. (2012) Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutr Cancer* 64:1103-1111.
27. Reddy BS, Rivenson A (1993) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.* 53:3914–3918.
28. Lim, BK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH (2002) Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. *Jpn J Cancer Res* 93:36–41.
29. Candela M, Guidotti M, Fabbri A, Brigidi P, Franceschi C et al. (2011) Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit Rev Microbiol.* 37:1-14.
30. Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H, Benno Y. (2011) Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One* 6:e23652.

31. Sperandio V, Torres AG, Kaper JB (2002) Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 43:809, 2002.
32. Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W (2003) Mutation in luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 71:1972-1979.
33. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J et al. (2007) The *Bacillus subtilis* Quorum-Sensing Molecule CSF Contributes to Intestinal Homeostasis via OCTN2, a Host Cell Membrane Transporter. *Cell Host & Microbe* 1:299–308.
34. Yan F, Polk DB (2002) Probiotic Bacterium Prevents Cytokine-induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 277:50959-50965.
35. Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB et al (2008) Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signalling. *Cellular Microbiology* 10:1442–1452
36. Fakhry S, Manzo N, D'Apuzzo E, Pietrini L, Sorrentini, I, et al. (2009). Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res. Microbiol.* 160:817-823
37. Zwacka M R, Stark L, Dunlop MG (2000) NF- κ B kinetics predetermine TNF α sensitivity of colorectal cancer cells. *J Gene Med* 2:334-343.
38. Roemer M M, Roemer K (2001) p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* 20:3387-3398.
39. Yan F, John SK and Polk DB (2001) Kinase suppressor of Ras determines survival of intestinal epithelial cells exposed to tumor necrosis factor *Cancer Res* 61:8668-8675.
40. D'Amours D, Sallmann FR, Vishva MD, Poiriers GG (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114:3771-3778

41. Kaufmann, SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53:3976-3985.
42. Sherr, CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501–1512.
43. Weinberg WC, Denning MF (2002) p21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13:453-464.
44. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M (2003) Proteasome-Mediated Degradation of p21 via N-Terminal Ubiquitinylation *Cell* 115:71–82.
45. Pollice A, Vivo M, La Mantia G (2008) The promiscuity of ARF interactions with the proteasome. *FEBS Letters* 582:3257–3262.
46. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH et al (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1773:1263–1284
47. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R et al. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
48. Vivo M, Di Costanzo A, Fortugno P, Pollice A, Calabrò V et al. (2009) Downregulation of Δ Np63 α in keratinocytes by p14ARF-mediated SUMO-conjugation and degradation. *Cell Cycle* 8:3545-3551.
49. Vivo M, Ranieri M, Sansone F, Santoriello C, Calogero RA et al (2013) Mimicking p14ARF Phosphorylation Influences Its Ability to Restrain Cell Proliferation. *PLoS One* 8:e53631.
50. Di Luccia B, Manzo N, Vivo M, Galano E, Amoresano A et al. (2013) A Biochemical and Cellular Approach to Explore the Antiproliferative and Prodifferentiative Activity of *Aloe Arborescens* Leaf Extract. *Phytother Res.* doi: 10.1002/ptr.4939.

Figure legends

Fig 1. HCT116 cell response to *L. gasseri* CM with or without TNF α treatment. Western blot with anti-PARP-1 antibody of whole cell extracts from HCT116 cells incubated in (A) complete cell culture medium supplemented or not with TNF α (1 nM) for 2, 8 or 24 hours; (B) complete cell culture medium supplemented or not with CM (20%v/v) for 16 hours before treatment with 1nM TNF α for 8 hours; (C) complete cell culture medium supplemented or not with TNF α (1 nM) for 8 hours and MDM (20%v/v) or MDM + lactic acid pH4 (20%v/v). After the treatments cells were collected, lysed and protein concentration determined. Equal amount of cell lysates were fractionated on SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies against PARP-1. Actin was used as a loading control.

Fig. 2 *L. gasseri* secretes bioactive soluble molecule(s) of proteinaceous nature during the stationary phase of growth. HCT116 cells were incubated in complete cell culture medium supplemented or not with TNF α (1 nM) for 8 hours and with A) CM fractionated with a cut-off of 3 kDa, or B) CM treated with different enzymes [Trypsin, Proteinase K, DNase I, RNase A], or C) CM of cultures at the indicated phases of growth. After the treatments, cells were collected, lysed and total cell extracts were analyzed by western blotting with antibodies against PARP-1. Actin was used as a loading control. PARP-1 band intensity was evaluated by ImageQuant analysis on at least two different expositions to assure the linearity of each acquisition. Values expressed as ratio with the corresponding actin values and normalised to the reference point (PARP-1 cleavage in medium). Percentage of increase (+) or decrease (—) with respect to the intensity of the reference point are indicated.

Fig. 3. The CM of *L. gasseri* SF1183 affects HCT116 cell number but not cell viability. Proliferating HCT116 cells were incubated in complete cell culture medium supplemented or not with CM (20%v/v). After 24 hours (A) controls (NT) and CM-treated (CM) cells were collected and counted in a Burkler chamber; or (B) incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-

5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium as a substrate and the absorbance of converted formazan measured at 490nm.

Fig. 4 The CM of *L. gasseri* SF1183 affects cell proliferation of HCT116 cells.

Proliferating HCT116 cells were incubated in complete cell culture medium supplemented or not with CM (20%v/v) and/or TNF α (1nM). After the treatments, cells were collected and treated for flow-cytometric analysis (A) or western blot (B) with the indicated antibodies.

Fig. 5 The anti-apoptotic effect of *L. gasseri* is not specific for TNF α -induced

apoptosis. Proliferating HCT116 cells were incubated in complete cell culture medium supplemented or not with CM (20%v/v) and/or cisplatin (30 μ M). After the treatments, cells were collected and treated for flow-cytometric analysis (A) or western blot (B) with the indicated antibodies.

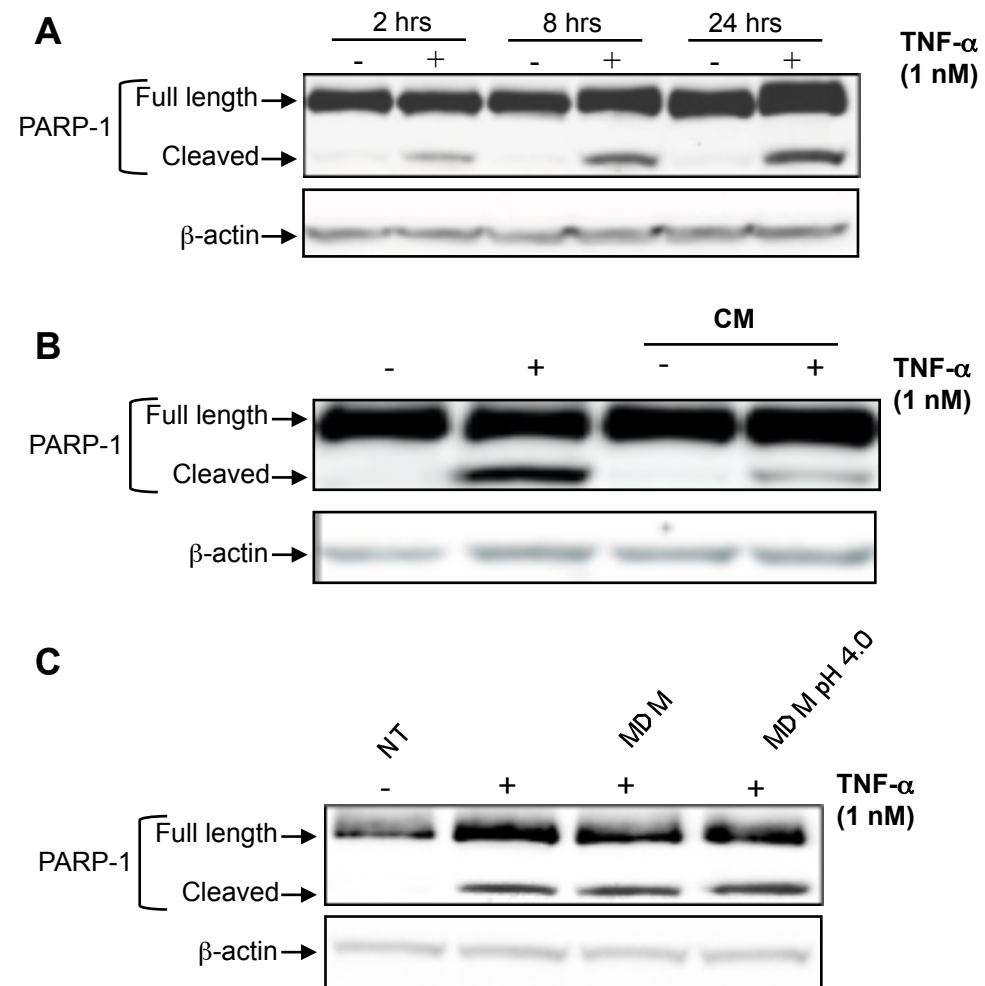


Fig. 1

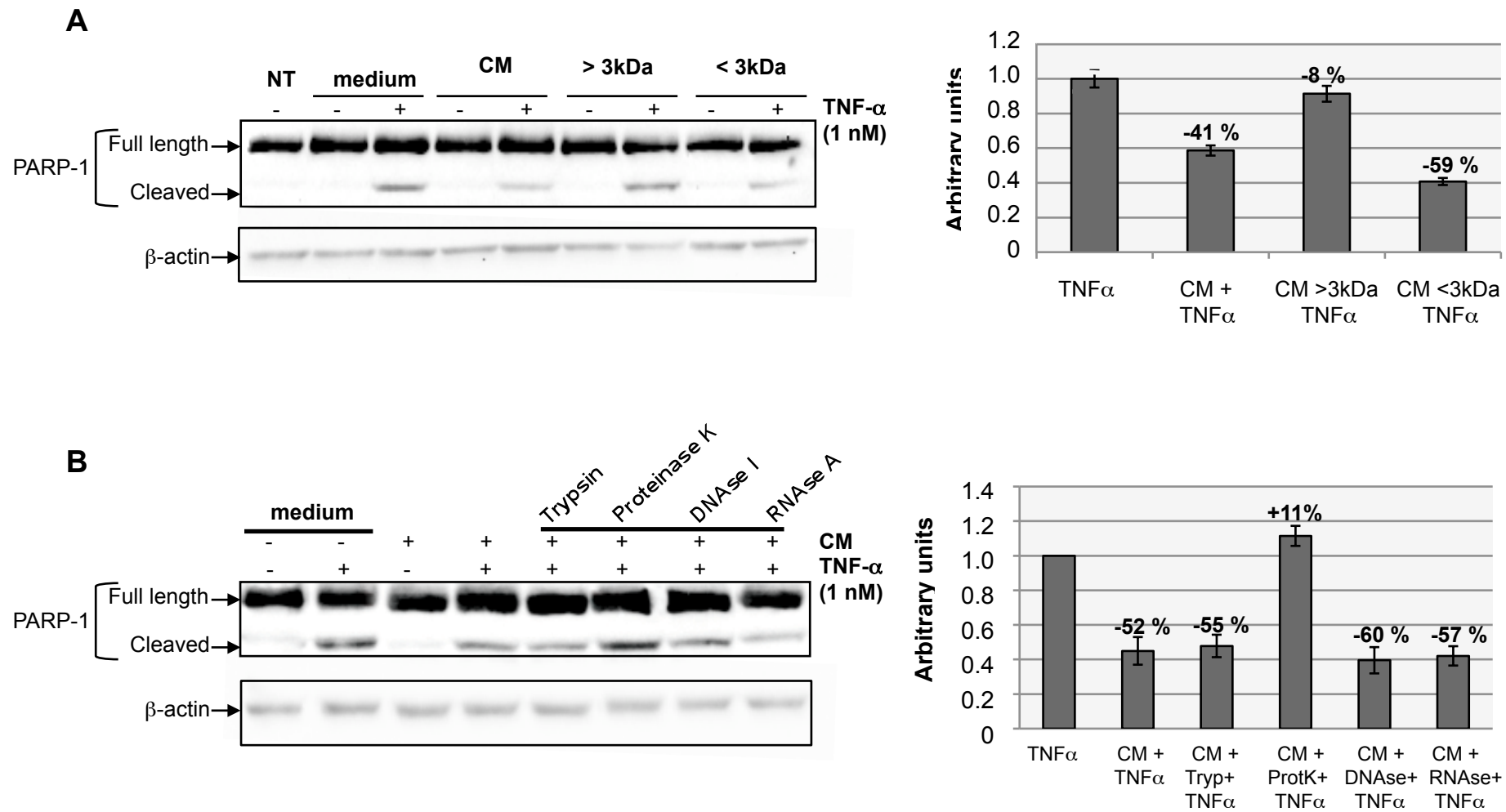


Fig. 2 - I

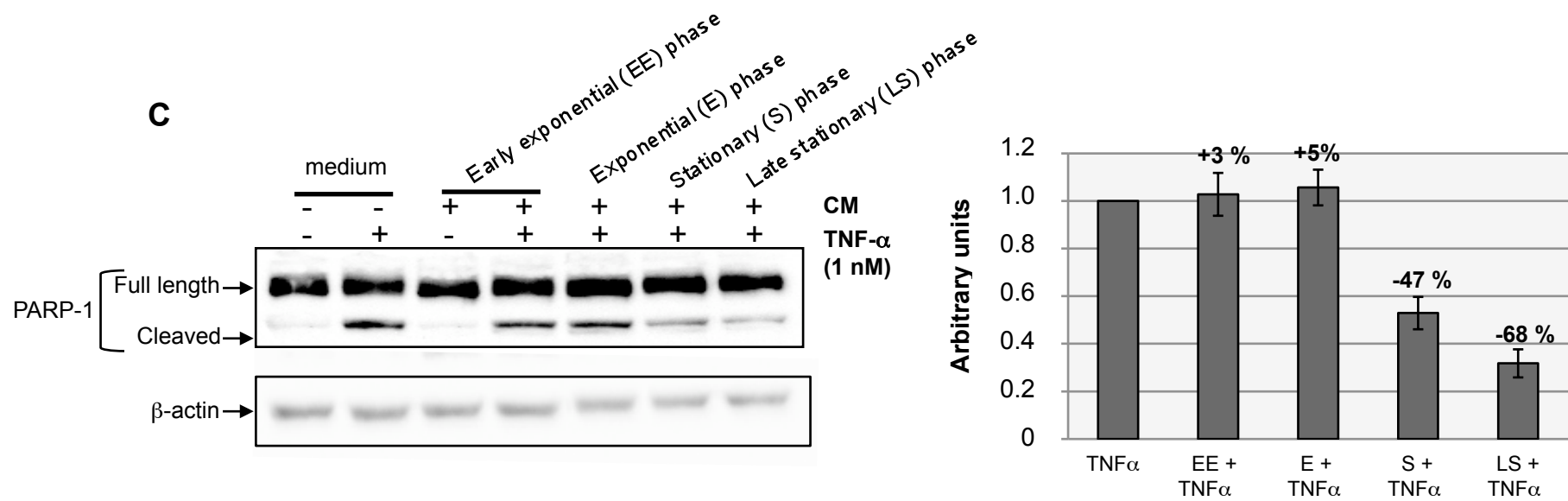


Fig. 2 - II

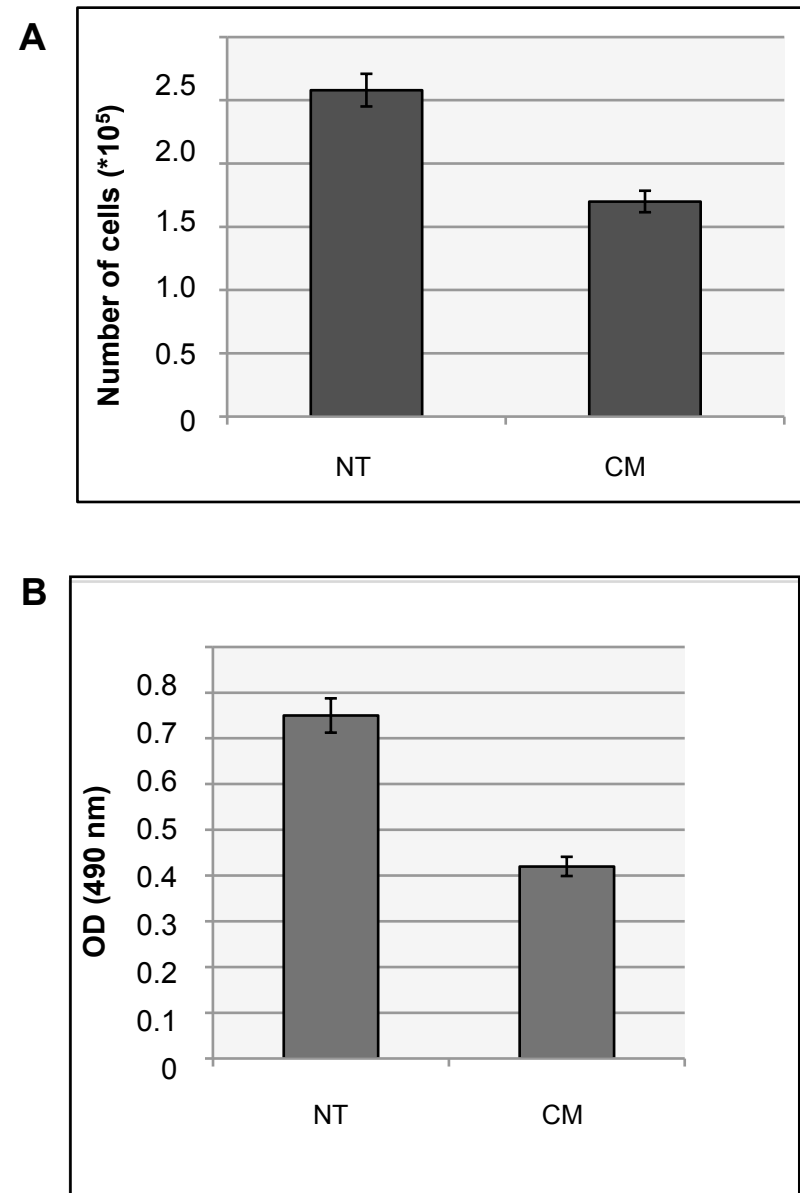
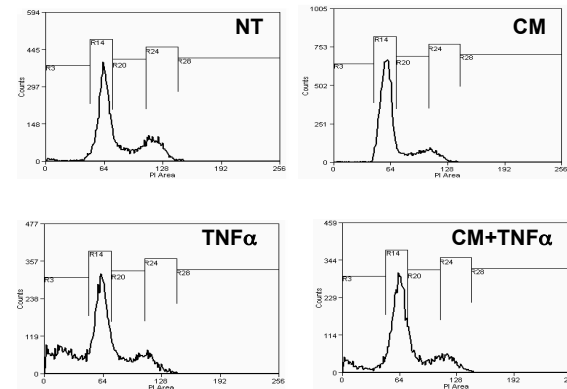
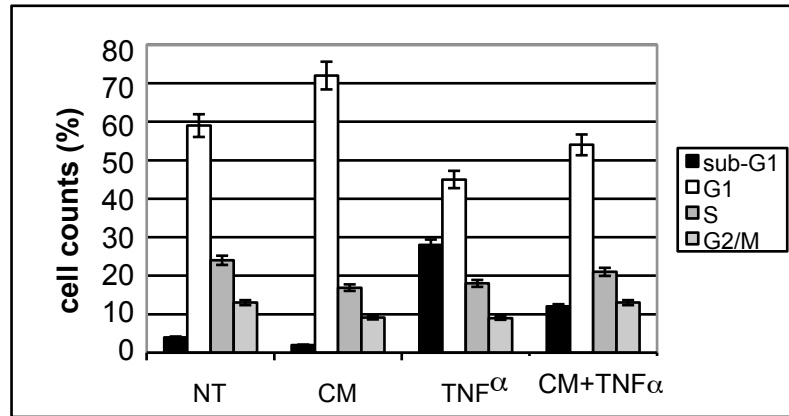
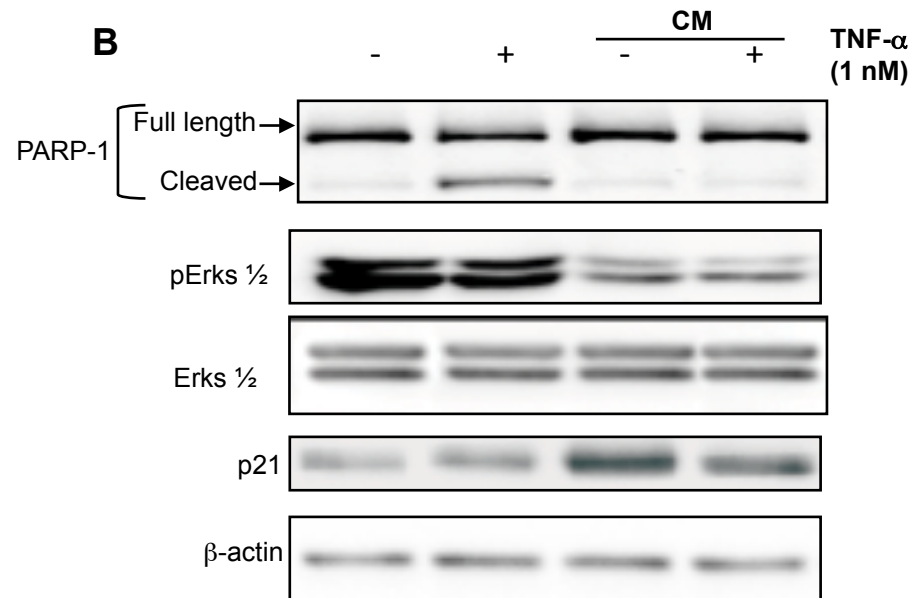
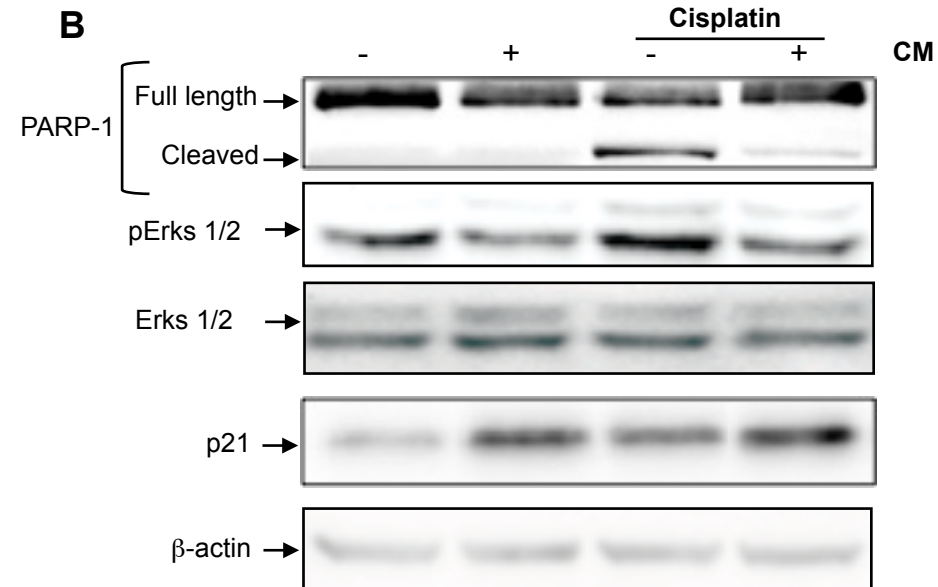
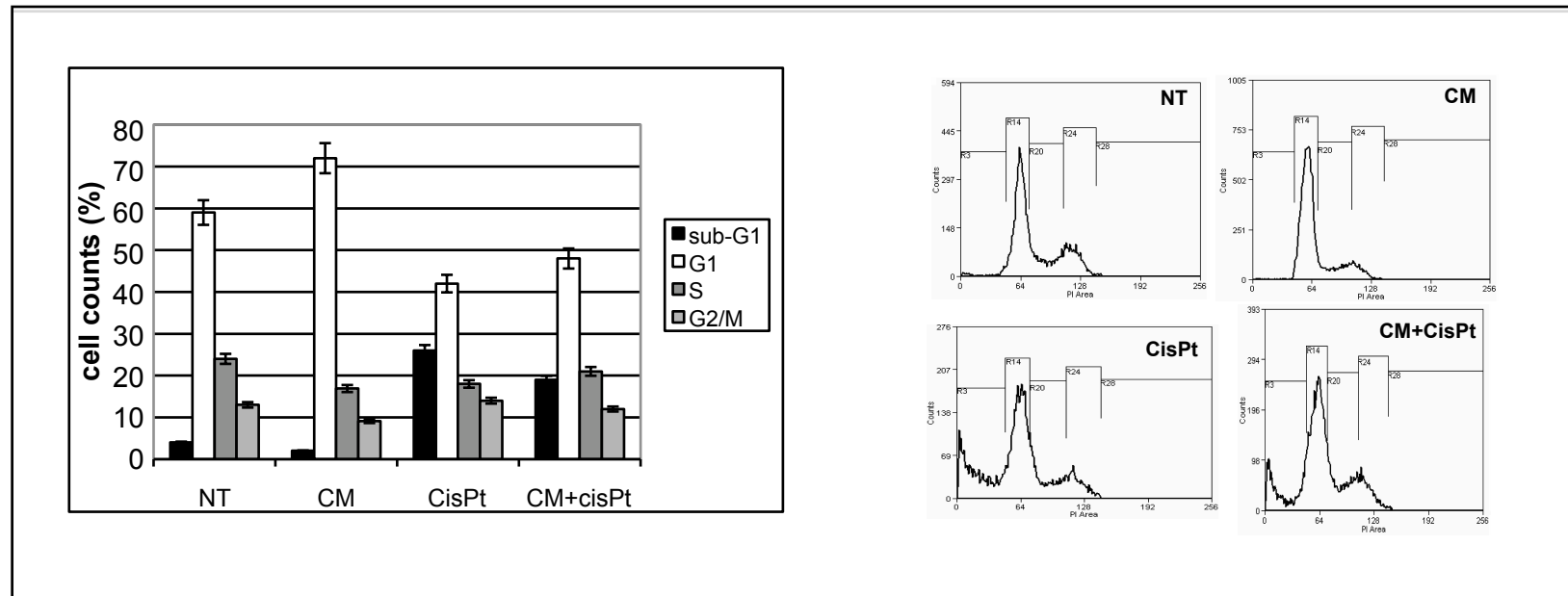


Fig. 3

A**B****Fig. 4**

A**Fig. 5**

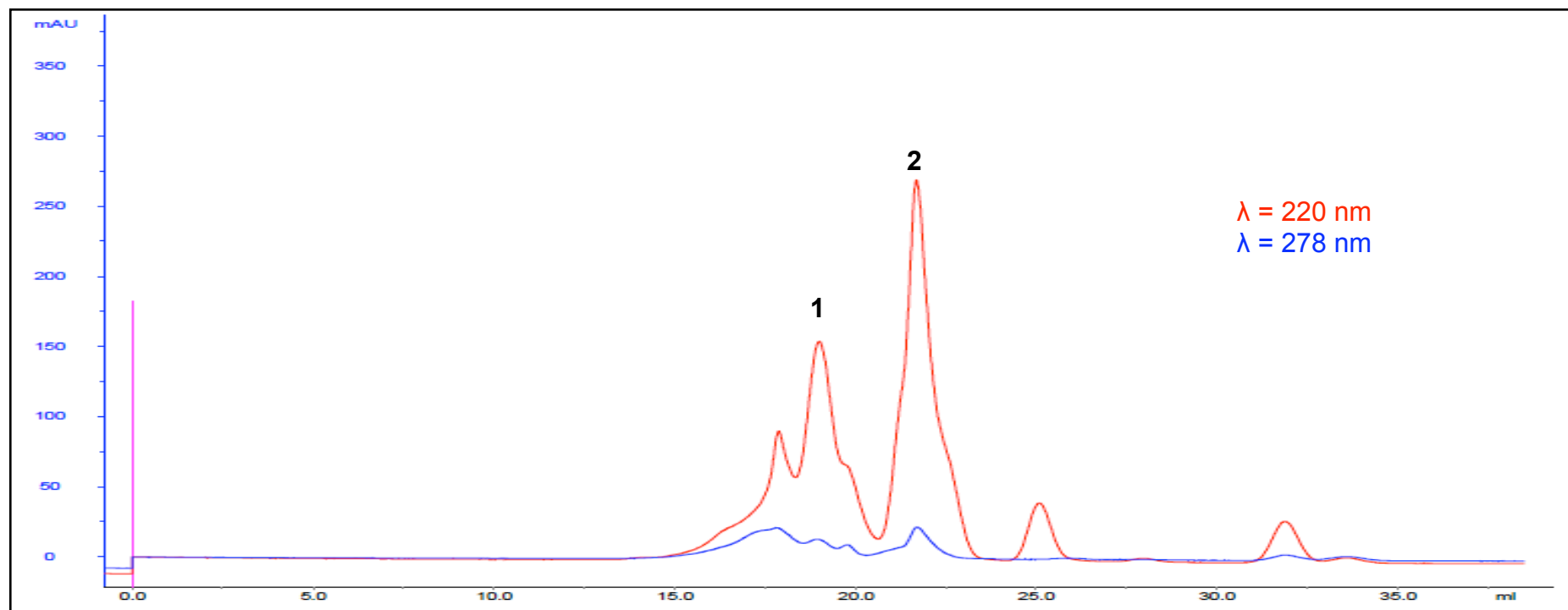


Fig. S1. The CM of *L. gasseri* was size fractionated with a 3 kDa molecular mass cut-off filter and loaded on a gel filtration chromatographic column (Superdex Peptide 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences). The elution buffer was AMAC 0.3 M. Two main peaks were observed at 220 nm

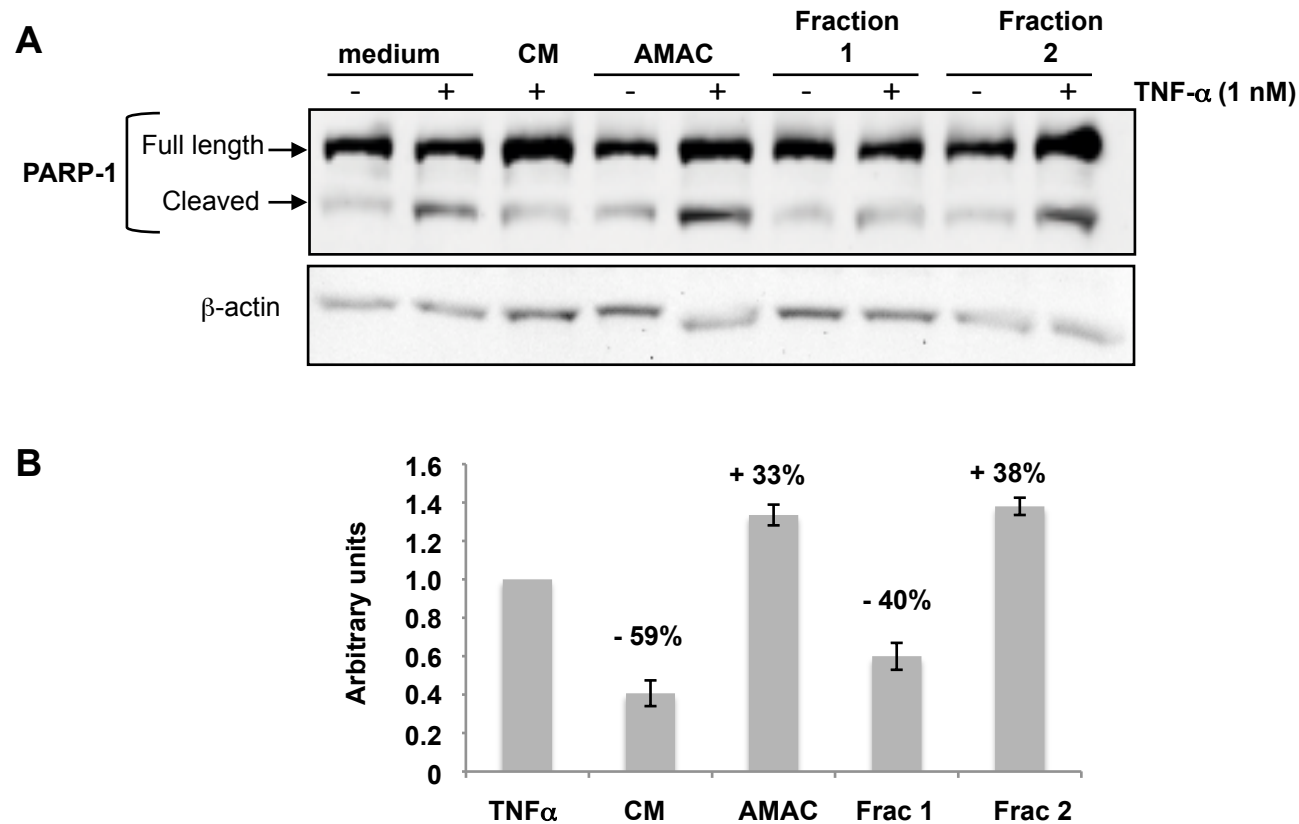


Fig. S2. Chromatographic fractions from the experiment of Fig. S1 were tested by western blotting with anti-PARP-1 antibody (A). As a control, cells were also treated with the elution buffer (AMAC 0,3 M). (B) Densitometric analysis of the western blot. PARP-1 band intensity was evaluated by ImageQuant analysis on at least two different expositions to assure the linearity of each acquisition. Values are expressed as ratio with the corresponding actin values and normalised to the reference point (PARP-1 cleavage in medium). Percentage of increase (+) or decrease (—) with respect to the intensity of the reference point are indicated.

CAPITOLO 4

Approccio biochimico e cellulare per lo studio
dell'attività antiproliferativa e pro-differenziativa degli
estratti di foglie di
Aloe Arborescens

4.1 Introduzione

Le piante e i loro estratti sono apprezzati per tutta una serie di caratteristiche come il loro aroma specifico, nutraceutico, e proprietà terapeutiche in quanto possono avere proprietà antimicrobiche, antiproliferative, anti-infiammatorie, immuno-stimolanti e antiossidative (Greathead, 2003).

Aloe arborescens Miller, appartenente al genere *Aloe* (Famiglia Liliaceae), è una delle principali varietà di *Aloe* usato in tutto il mondo. Esso è commercialmente coltivato nel Sud America (Brasile e Uruguay), Sud Africa e in alcuni Paesi asiatici. L'estratto concentrato attivo dal *Aloe arborescens* condivide alcune proprietà terapeutiche con l'*Aloe vera* ben noto e studiato ed è comunemente utilizzato in applicazioni mediche per il trattamento di ferite dovute a scottature e aiuta l'accelerazione del processo di guarigione della pelle. Recenti studi hanno dimostrato che *Aloe arborescens* è caratterizzato da attività immunostimolante negli animali (Infascelli et al., 2010), ed è stato dimostrato che può avere proprietà benefiche fitoterapiche ed antitumorali (Lissoni et al., 2009). È noto che le proprietà antitumorali dell'*Aloe arborescens* non dipendono solo dal suo effetto immunomodulante, ma anche da una inibizione diretta della proliferazione delle cellule tumorali (Bedini et al., 2009). Gli effetti immunostimolanti sono dovuti ad acemannano, mentre gli effetti antiproliferativi sono stati attribuiti a composti antracenici, antrachinonici e simil-aloenina (Lissoni et al., 2009). L'*Aloe arborescens* è

anche nota per la sua effettiva proprietà di trattamento delle scottature e per la capacità di aumentare la guarigione delle ferite della pelle. Inoltre, è stato dimostrato essere utile nel ridurre la crescita microbica e uccidere una vasta gamma di virus e funghi, fornendo in tal modo un sostegno straordinario a vari tessuti quali il tratto gastrointestinale, membrane mucose, e tessuto connettivo (A. Falcetti, comunicazioni personali). Per determinare gli effetti terapeutici di *Aloe arborescens*, sono state effettuate un considerevole numero di indagini cliniche, tuttavia, solo pochi studi hanno affrontato gli effetti biologici dell' *Aloe* a livello molecolare. L'obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la risposta cellulare al trattamento con estratto grezzo di foglie di *aloe arborescens* attraverso un approccio biochimico e cellulare per supportare la sua applicazione come agente terapeutico.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Preparazione dell' estratto grezzo di foglie.

Le piante provenienti da allevamenti italiani (Marsala, Sicilia) certificate per i sistemi organici, coltivate in habitat naturali e raccolte quando erano più vecchie di 4 anni. Le foglie sono state lavate in vasche, poste in sacchetti di plastica, successivamente lavate a 25°C e spazzolate per eliminare impurità esterna. Dopo l'asciugatura all'aria, le foglie sono state sottoposte ad un '*metodo a freddo*' fornito da HDR sas (Caserta, Italia), che permette di estrarre

i principi attivi sia dalla parte interna che dalla cuticola. Tale preparazione professionale di estratto di Aloe è stato stabilizzato con sorbato di potassio e acido citrico. Successivamente, l'estratto è stato conservato ancora una volta in contenitori che sono stati però sigillati per evitare il contatto con l'aria.

4.2.2 Trattamento delle colture cellulari con Aloe Arborescens.

Le cellule primarie **NHEK** di origine neonatale, ci sono giunte da Clonetics (San Diego, California). Le linee cellulari **HaCaT** (cheratinociti umani immortalizzati) e **MDA-MB231** (adenocarcinoma mammario umano) sono state mantenute in Eagle's Medium Dulbecco's Modified (*DMEM*) integrato con 10% di siero fetale bovino e 1% di penicillina-streptomicina. Le linee cellulari di cheratinociti derivati da carcinoma squamoso (**SCC011** **SCC012** e) sono state già precedentemente descritte (Lefort et al., 2007). La linea cellulare delle **A431** (carcinoma epidermoide umano) è stata mantenuta in RPMI 1640 integrato con 10% siero fetale bovino e 1% di penicillina-streptomicina. Tutte le linee cellulari utilizzate sono state coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Aliquote di estratto di foglia fresca di *Aloe arborescens* sono stati centrifugati a 10000 rpm per 10 min e sterilizzati usando unità di filtri a siringa monouso della Millex con pori di dimensioni pari a 0,22 micron (Millipore). L'Estratto sterile ottenuto è stato impiegato per il trattamento a 10, 20, e 50% v/v, nel mezzo di coltura cellulare. Cellule trattate e non trattate con aloe sono state raccolte e analizzate per Western-blot come descritto di seguito.

4.2.3 *Analisi della crescita cellulare.*

Cellule di cheratinociti umani immortalizzati (HaCaT), adenocarcinoma mammario metastatico MDA-MB231, carcinoma epidermoide umano A431, cellule epiteliali umane di adenocarcinoma del colon-retto Caco2, e cheratinociti derivati da carcinoma squamoso (SCC011, SCC022) sono stati piastrati in piastre da 35 mm, ad una densità cellulare di 1×10^5 cellule/piastra. Le cellule sono state coltivate in terreno di crescita completo implementato o non con aliquote di estratto fresco di *Aloe arborescence* (10% v/v) per 6, 24, 30, 48 e 54h, raccolte e contate grazie all'ausilio di una *camera di Burker*. Estratti cellulari provenienti sia da cellule trattate che da cellule non trattate sono stati preparati e sottoposti a *SDS-PAGE* e immunoblotting per analisi di espressione genica.

4.2.4 *Analisi di citometria di flusso*

Dopo trattamento, le cellule sono state lavate due volte con tampone fosfato isotonico (PBS) e raccolte con tripsina 0,05% in 0,15% Na_2EDTA . Le cellule sono state quindi centrifugate, lavate in PBS, fissate con etanolo ghiacciato 70%, e conservate per una notte a 4°C. Le cellule fissate sono state lavate in PBS e poi incubate con ioduro di propidio (50 mg/ml) e RNasi A (10 mg / ml) per 30 min a temperatura ambiente. L'acquisizione dei dati è stata effettuata

utilizzando un Citofluorimetro CyAn ADP (Beckman Coulter, Inc., Milano, Italia).

4.2.5 *Differenziamento dei cheratinociti*

le cellule Non tumorali HaCaT sono state scelte perché conservano la capacità di differenziare se trattate con Ca^{2+} e rappresentano quindi un intermediario tra cheratinociti normali e cancerosi. Le cellule HaCaT sono state coltivate fino a confluenza in terreno di crescita completo e poi sostituito con terreno di differenziamento (DMEM privo di siero) contenente 1,2 mM di CaCl_2 , con o senza estratto di Aloe (10% v/v) per 6 giorni come già precedentemente descritto nel lavoro di *Vivo et al del 2009* con l'eccezione che il mezzo è stato cambiato ogni 48 ore. Le Cellule differenziate trattate e non trattate con Aloe sono state raccolte e analizzate per SDS-PAGE e immunoblot come descritto successivamente. Le cellule NHEK sono state coltivate nel terreno di crescita dei cheratinociti privo di siero contenente 0,05 mM di calcio. Le cellule NHEK con 70%-80% di confluenza cellulare sono state passate in terreno ad elevate quantità di calcio (1,2 mM) per indurre il processo di differenziamento. Gli estratti di cellule NHEK trattati e non trattati con Aloe sono stati poi sottoposti a SDS-PAGE e l'analisi immunoblot come descritto successivamente.

4.2.6 SDS-PAGE e immuno-blot

Cellule trattate e non trattate con *Aloe arborescens* sono state raccolte in tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 fenilmetilsulfonyl fluoruro mM, 0,5% sodio desossicolato, e inibitori della proteasi). Le cellule lisate sono state incubate in ghiaccio per 40 min, e gli estratti sono stati centrifugati a 13.200 rpm per 15 minuti per rimuovere tutti i detriti cellulari. La concentrazione proteica è stata determinata tramite l'utilizzo della *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad). Dopo l'aggiunta di Laemmli buffer 2x (SIGMA), i campioni sono stati bolliti a 100°C per 5 minuti e separati tramite un processo di elettroforesi su gel di poliacrilammide. Le proteine sono state poi trasferite su una membrana di *polivinilidene di fluoruro* (PVDF-Millipore). La membrana PVDF è stata immersa in 5% w/v di buffer di latte (5% w/v di latte non grasso liofilizzato, 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,2% Tween 20) ed incubata con anticorpi primari diluiti in 5% w/v di buffer di latte o di siero bovino di albumina per 2 ore a temperatura ambiente o per una notte a 4°C. Gli anticorpi primari utilizzati sono: **anti-mouse p63-4A4** (Calbiochem), **anti-mouse involucrina** (Abcam antibody), **anti-mouse citocheratina 1** (Santa-Cruz Biotechnology), **anti-rabbit transglutaminasi di tipo 2** (Abcam antibody), **anti-rabbit Perks 42/44** (Cell Signalling), **anti-rabbit p21** (Santa-Cruz Biotechnology), **anti-rabbit ciclina D1** (Cell Signalling), **anti-rabbit PARP-1** (Cell Signalling), e **anti-goat b-actina** (Santa-Cruz Biotechnology). I dati ottenuti sono stati visualizzati mediante il

metodo enhanced chemiluminescence (GE-Healthcare) con anticorpi secondari HRP-coniugati (Santa-Cruz Biotechnology) incubati per 1 ora a temperatura ambiente e analizzati tramite software Quantity One di ChemiDocTMXRS system (Bio-Rad)

4.2.7 Colorazione delle cellule per la fluorescenza

le cellule SCC011 e SCC022 sono state piastrate in capsule sterili e trattate o meno con estratto di *Aloe arborescens* (10% v/v) per 48 h. Dopo il trattamento, sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS, e le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% a temperatura ambiente per 15 min. Poi, le cellule sono state incubate con WGA (Wheat Germ Agglutinin), un colorante fluorescente che si lega specificamente alle membrane (1:200) per 1 ora a 37°C. Dopo tre lavaggi con PBS, le cellule sono state permeabilizzate con 0.5% di Triton-X100 (Sigma-Aldrich, Selze/Germania) a temperatura ambiente per 5 min. Successivamente alla permeabilizzazione, le cellule sono state incubate con DAPI (1:10000) per 3 minuti a RT. Dopo tre lavaggi con Tween-PBS allo 0,05%, i vetrini sono stati montati e analizzati.

4.2.8 *Analisi dei metaboliti*

Aliquote di un preparato commerciale di estratto di aloe sono stati sottoposti ad una procedura di estrazione liquido-liquido utilizzando quantità uguale di cloroformio (1:1 v/v). La fase di estrazione è stata eseguita tre volte, e gli estratti organici sono stati raccolti ed essiccati. Le miscele di analiti sono stati infine trimetilsililati in 200 ml di N,O-bis (trimetilsilil) acetammide a 80°C per 45 min. Il campione è stato essiccato, sciolto in 50 ml di esano, e centrifugato per rimuovere l'eccesso di reagenti solidi. Il supernatante esano (1/50) è stato utilizzato per l'analisi GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry).

4.2.9 *Analisi GC-MS*

Analisi GC-MS sono state eseguite su uno spettrometro di massa quadrupolo MSD 5390 (Agilent Technologies) equipaggiato con un gascromatografo tramite l'utilizzo di una colonna capillare in silice fusa DB-5MS (30 m, ID 0,5 mm, 0,25 ft mm) da G&W. La temperatura di iniezione è stata 250°C. Per le analisi dei lipidi, la temperatura del forno è stata aumentata da 25°C a 90°C in 1 minuto e mantenuta a 90°C per 1 minuto prima di aumentare a 140°C con una velocità di 25°C/min, fino a 200°C con una velocità di 5°C/min e fino ad arrivare a 300°C con una velocità di 10°C/min. Gli spettri di massa dovuti alla ionizzazione degli elettroni è stata registrata da una continua scansione quadrupolo a una energia di ionizzazione di 70eV. Ogni

specie è stata interpretata sulla base dell'impatto elettronico degli spettri (NIST library e Analyst Software).

4.2.10 Elettroforesi bidimensionale (2DE)

La prima dimensione dell'elettroforesi (focalizzazione isoelettrica, IEF) è stata effettuata su gradienti non lineari di pH (pH 4-7; strisce IPG lunghe 7 centimetri, GE Healthcare, Uppsala, Svezia) e realizzato con il sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare, Uppsala, Svezia). 200 mg di estratti di proteina sono stati precipitato con metanolo/cloroformio (Wessel e Flugge, 1984) e solubilizzati in 125 ml di tampone di reidratazione e 0,2% (v/v) di vettore anfolita per 12 h, a 50 mA, a 20°C. I nastri sono stati quindi utilizzati secondo le seguenti condizioni elettriche a 20°C: 500 V per 30 minuti, 1000 V per 30 min, 5000 V per 10h, fino a un totale di 15000 Vt raggiunte. Dopodiché , le IPG strips analitica e preparativa sono state equilibrate per 15 min in urea 6M, 30% (V/V) di glicerolo, 2% (w/v) di SDS, 0,05 M Tris-HCl, pH 6,8, 1% (w/V) ditiotreitolo (DTT), e successivamente per 15 minuti nella stessa soluzione urea/SDS/Tris, ma sostituendo l'1% (w/v) di DTT con 2,5% (w/v) iodoacetamide.

La seconda dimensione è stata condotta su gel di poliacrilammide 12,5% (w/w) (10 cm x 8 centimetri x 0,75 mm) a corrente costante pari a 25 mA e a 10°C fino a che il fronte del colorante avesse raggiunto il fondo del gel (Laemmli,

1970. Hochstrasser et al, 1988). I gel preparativa sono stati colorati overnight con Coomassie Brilliant Blue e decolorato con acqua MilliQ.

4.2.11 Analisi delle immagini

Le immagini dei Gel sono state acquisite con uno scanner Epson expression 1680 PRO. L'analisi dell'immagine Computerizzata 2-D è stata effettuata utilizzando il software ImageMasterTM Platinum 2D. I Volumi relativi agli spot (% V) ($V = \text{integrazione del OD sull'area spot}$; $\%V = V \text{ singolo spot} / V \text{ posto totale}$) sono stati utilizzati per l'analisi quantitativa al fine di ridurre gli errori sperimentali.

4.2.12 Digestione in situ

Tripsina, DTT, iodoacetamide, e acido R-ciano-4-idrossicinnamico sono stati acquistati da Sigma. L' NH_4HCO_3 invece da Fluka. L'acido trifluoracetico per HPLC da Carlo Erba. Sono stati utilizzati tutti reagenti e solventi di altissima purezza. L'analisi è stata effettuata sugli spot blu colorati con il blu-Coomassie escissi dal gel. Gli spot sono stati asportati dal gel e decolorati tramite lavaggi ripetuti con 0,1M di NH_4HCO_3 , pH 7,5, e acetonitrile. I campioni sono stati ridotti tramite incubazione con 50 μl di 10 mM DTT in 0,1M di tampone NH_4HCO_3 , a pH 7,5 e carboxyamidomethylated con 50 μl di 55 mM iodoacetamide nello stesso tampone. La digestione enzimatica è stata condotta

con tripsina (12,5 ng/ml) in tampone di bicarbonato di ammonio 10 mM, pH 7,8. Pezzi di gel sono stati incubati a 4°C per 2 h. La Soluzione di tripsina è stata poi rimossa, ed è stata aggiunta una nuova aliquota della stessa soluzione; i campioni sono stati incubati per 16 ore a 37°C. Un volume di reazione minimo è stato utilizzato per ottenere la completa reidratazione del gel. I peptidi sono stati poi estratti tramite lavaggio delle particelle di gel con bicarbonato d'ammonio 10mM e 1% di acido formico in 50% acetonitrile a temperatura ambiente. Le miscele di peptidi risultanti sono stati filtrati con 0,22 PDVF filtro Millipore, seguendo la procedura consigliata.

4.2.13 Analisi mediante nanoHPLC-chip MS/MS

Le miscele di peptidi sono stati analizzati utilizzando un CHIP MS 6520 QTOF dotato di un sistema di HPLC capillare 1200 e un *chip cube* (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca). Dopo il caricamento, la miscela di peptidi (8 µl in 0,1% di acido formico) è stata concentrata e lavata a 4µl min⁻¹ (Agilent Technologies Chip), con 0,1% di acido formico in 2% acetonitrile come eluente. Il campione è stato poi frazionato su una colonna capillare C18 a fase inversa (75 µm x 43mm nel Agilent Technologies chip) alla portata di 400 nl min⁻¹ con un gradiente lineare di eluente B (0,1% di acido formico in 95% acetonitrile) in A (0,1% acido formico in 2% acetonitrile) dal 7 al 60% in 50 min.

L'analisi dei peptidi è stata eseguita utilizzando un'acquisizione dipendente dai dati di un *MS scan* (intervallo di massa dai 400 ai 2000 m/z) seguito da scansioni MS/MS (spettrometria di massa in tandem) dei tre ioni più abbondanti in ogni scansione MS. Le acquisizioni MS/MS sono state trasformate in un formato generico *Mascot* e utilizzate per l'identificazione dei peptidi con una versione con MASCOT 2.1, in un database (Swiss Pro).

4.2.14 Identificazione delle proteine

I dati grezzi ottenuti da nano-LC-MS/MS sono stati analizzati utilizzando il software di analisi qualitativa, e gli spettri MSMS sono stati ricercati in database di proteine non-ridondanti (sequenze NCBI nr 20090924, 9760158) e UniprotSwissprot (2011, 167910 sequenze), usando la restrizione tassonomia di *Homo sapiens*, con il software MASCOT 2.1 (Matrix Science, Boston, USA). I parametri di ricerca Mascot sono stati: 'tripsina' come enzima che permette fino a tre fratture, "carbamidomethyl" come modifica fissa, l'ossidazione di M, pyroGlu N-ter Q, come modifiche variabili, 20 ppm di tolleranza MSMS, e 0,6Da di tolleranza peptide. Il punteggio utilizzato per valutare la qualità dei matches per i dati MSMS è stato superiore a 32.

4.2.15 Microscopia a contrasto di fase

Le cellule HaCaT e le cellule A431 sono state coltivate e (HaCaT) indotte a differenziarsi su vetrini copri-oggetto in piastre a sei pozzetti, lavate con PBS e fissate con metanolo freddo per 10 min. Le cellule trattate e non trattate sono state fotografate con un ingrandimento 40x previa osservazione al microscopio Olympus BX51.

4.2.16 Ceppi batterici e condizioni di crescita

Ceppi batterici utilizzati in questo studio sono stati *Bacillus cereus* (6A2) (Naclerio et al., 1993), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocitogenes* (ATCC 7644), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella sonnei* (ATCC25931), *Escherichia coli* (DH5a), *Bacillus subtilis* (PY79) (Youngman et al., 1984), *Lactobacillus mucosae* (SF1031), e *Lactobacillus gasseri* (SF1109) (Fakhry et al., 2009). Colture di Lattobacilli sono state coltivate in terreno MRS (Difco) a 37°C in condizioni micro-aerofile, mentre per tutti gli altri ceppi è stato utilizzato terreno ricco LB (8 g/l NaCl, 10 g/l triptone, 5 g/l di estratto di lievito) e condizioni di crescita aerobiche a 37°C. Terreni di crescita liquidi contenenti aloe, sono stati ottenuti aggiungendo 2 ml di un estratto acquoso di foglie di Aloe a 8 ml di terreno LB o MRS, e sono stati inoculati con 0,1 ml di una coltura batterica cresciuta

overnight, infine sono state seguite le crescite a 37°C per 8-12 ore grazie all'ausilio dello spettrofotometro (OD600).

4.2.17 Test antibatterici

Per ogni ceppo utilizzato, aliquote di 100 µl di coltura di crescita giunta in fase esponenziale sono state miscelate con 10 ml di LB o MRS soft agar (agar allo 0,7%). Alle piastre gelificate sono stati poi aggiunti 10 µl di estratto di *Aloe arborescens*, e sono state incubate a 37°C. L'alone di inibizione è stato misurato come già precedentemente riportato (Baccigalupi et al., 2005). Gli effetti degli estratti di *Aloe arborescens* sulla crescita batterica sono stati misurati su piastre di LB e MRS agar preparate con l'aggiunta ai terreni di varie diluizioni di estratto di Aloe (1:1, 1:5, 1:10) e poi sono state aggiunte piccole aliquote (10 µl) di ciascuna coltura batterica in fase di crescita stazionaria sulle piastre solidificate. Le piastre contenenti l'Aloe sono state poi incubate 37°C e controllati sulla base della crescita batterica dopo 24 e 48 ore.

4.3 Risultati e discussione

4.3.1 Analisi GC-MS

La composizione del preparato di *Aloe arborescens* è stato determinato mediante gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa, in seguito ad estrazione in fase liquida organica dei differenti analiti contenuti

nell'estratto di aloe. In particolare, tutte le specie estratte dalla miscela di partenza, sia presenti in fase organica che in fase acquosa, sono state opportunamente derivatizzate con trimetilsilano (TMS) prima di essere analizzati al gascromatografo monitorando la corrente ionica totale in funzione del tempo, e l'identificazione delle specie stesse è stata effettuata sulla base degli spettri di frammentazione ottenuta per impatto elettronico. Tutte le analisi descritte sono state effettuate in triplicato. Nella fase organica sono stati individuati principalmente acido esenoico, sorbico e benzoico mentre in quelle acquosa sono state rilevate 22 specie chimiche differenti (**tabella 4.1 pagina seguente**).

Sorprendentemente, non è stata riscontrata la presenza di Aloina, uno dei principali componenti con attività farmacologiche presenti negli estratti di diverse specie di Aloe, bensì è stata rilevata una quantità significativa di Aloe-emodina dalle note attività antitumorali (Pecere et al., 2000).

Tabella 4.1. Elenco delle specie identificate mediante GC-MS nella preparazione Aloe arborescens commerciale. L'abbondanza relativa è espresso come percentuale del volume totale iniettato. Conservanti sono indicati in grassetto.

| Peak N° | Retention time (min) | Compound | Molecular formula | % of total |
|-----------|----------------------|---|--|--------------|
| 1 | 4.28 | Sorbic acid | C₆H₈O₂ | 3.88 |
| 2 | 5.00 | Benzoic acid | C ₇ H ₆ O ₂ | 10.95 |
| 3 | 5.16 | Phosphoric acid | H ₃ PO ₄ | 9.27 |
| 4 | 5.76 | Succinic acid | C ₄ H ₆ O ₄ | 11.67 |
| 5 | 6.17 | Itaconic acid | C ₅ H ₆ O ₄ | 0.27 |
| 6 | 7.54 | Octanoic acid | C ₈ H ₁₆ O ₂ | 0.10 |
| 7 | 8.68 | Malic acid | C ₄ H ₆ O ₅ | 0.06 |
| 8 | 9.19 | 4-hydroxycyclohexylcarboxylic acid | C ₇ H ₁₂ O ₃ | 1.76 |
| 9 | 10.08 | Rythronic acid | C ₁₆ H ₄₀ O ₅ Si ₄ | 0.08 |
| 10 | 10.58 | α-hydroxycinnamic acid | C ₉ H ₁₀ O ₃ | 0.11 |
| 11 | 12.01 | Pimelic acid | C ₇ H ₁₂ O ₄ | 0.35 |
| 12 | 13.17 | Isocitric acid lactone | C ₆ H ₈ O ₆ | 0.39 |
| 13 | 13.50 | Cyclooctene-1,2-diol | C ₈ H ₁₄ O ₂ | 0.21 |
| 14 | 13.71 | Tricarballic acid | C ₆ H ₈ O ₆ | 0.96 |
| 15 | 14.21 | para-Coumaric acid | C ₉ H ₈ O ₃ | 0.38 |
| 16 | 14.72 | Terephthalic acid | C ₈ H ₆ O ₄ | 0.08 |
| 17 | 15.27 | Citric acid | C₆H₈O₇ | 44.74 |
| 18 | 16.37 | Ferulic acid | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 0.15 |
| 19 | 17.11 | 2,4,6-tri-tert-butylphenol | C ₁₈ H ₃₀ O | 0.24 |
| 20 | 18.34 | Palmitic acid | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 0.10 |
| 21 | 19.92 | 1H-Indole-2,3-dione-6-ethoxy | C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₅ | 0.08 |
| 22 | 22.26 | 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione (Aloe-emodin) | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 14.01 |

4.3.2 L'aloe arborescens colpisce la proliferazione delle cellule cancerose.

E 'già noto che l'*Aloe arborescens* ha effetti antiproliferativi e antitumorali (Lissoni et al, 2009;.. Bedini et al, 2009), tuttavia, i meccanismi molecolari alla base della risposta cellulare al trattamento dell'Aloe restano ancora da definire. Questo ci ha spinto ad analizzare l'effetto di un estratto di foglia dell' *Aloe arborescens* sulla proliferazione sia a livello cellulare che a livello molecolare, confrontando il tasso di proliferazione cellulare, la distribuzione del ciclo

cellulare, e l'espressione di marcatori molecolari correlati al ciclo cellulare in cellule umane trattate e non trattate con Aloe. Queste analisi sono state effettuate in cellule A431 (carcinoma epidermoide della pelle), MDA-MB231 (carcinoma mammario metastatico), Caco-2 (adenocarcinoma epiteliale del colon-retto), e HaCaT cheratinociti spontaneamente immortalizzati. Come mostrato in Fig.4.1(vedi pagina successiva), abbiamo trovato in maniera riproducibile che l'estratto di Aloe riduce il tasso di proliferazione cellulare in tutte le linee cellulari testate. A 54 h di esposizione all' Aloe, è stata osservata una riduzione dal 30 al 40% del numero di cellule in MDA-MB231, Caco2, e HaCaT, mentre le cellule A431 bloccano il processo proliferativo e subiscono una drastica morte cellulare (Fig. 4.1D pag. successiva).

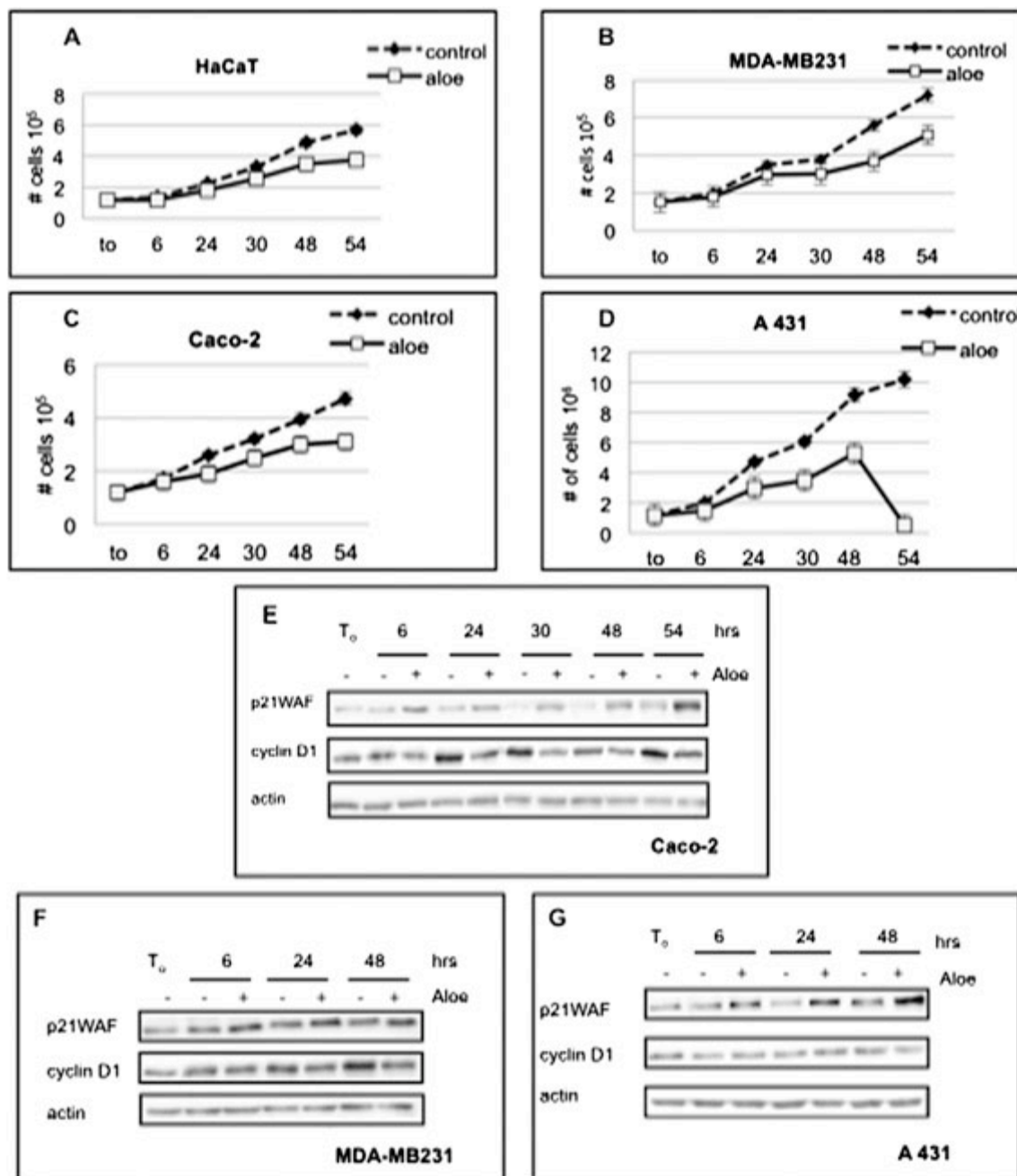


Figura 4.1. (A) HaCaT, (B), MDA-MB231, (C) Caco-2, (D) A431 proliferanti. Le cellule sono state incubate in terreno completo con o senza estratto di Aloe (1:10 v/v). Cellule di controllo e trattate con Aloe sono state raccolte a 6, 24, 30, 48 e 54 h e contate in una camera di Burkner. Cellule proliferanti (E) Caco-2, (F), MDA-231, (G) A431 sono state incubate in mezzo di coltura con o senza estratto di Aloe (01:10 v / v). Cellule di controllo e trattate con Aloe sono state raccolte a tempi diversi (h). Pari quantità di lisati cellulari sono stati sottoposti a analisi di immunoblot con anticorpi contro ciclina D1 e p21WAF. L' Actina è stata utilizzata come controllo di caricamento.

La distribuzione del ciclo cellulare delle cellule di controllo e di quelle trattate con l' Aloe è stata analizzata mediante citometria di flusso che mostrano come

le cellule HaCaT manifestino solo un leggero aumento (3%) della percentuale di G2/M dopo 48 ore di trattamento con l'Aloe (Fig. 4.2),

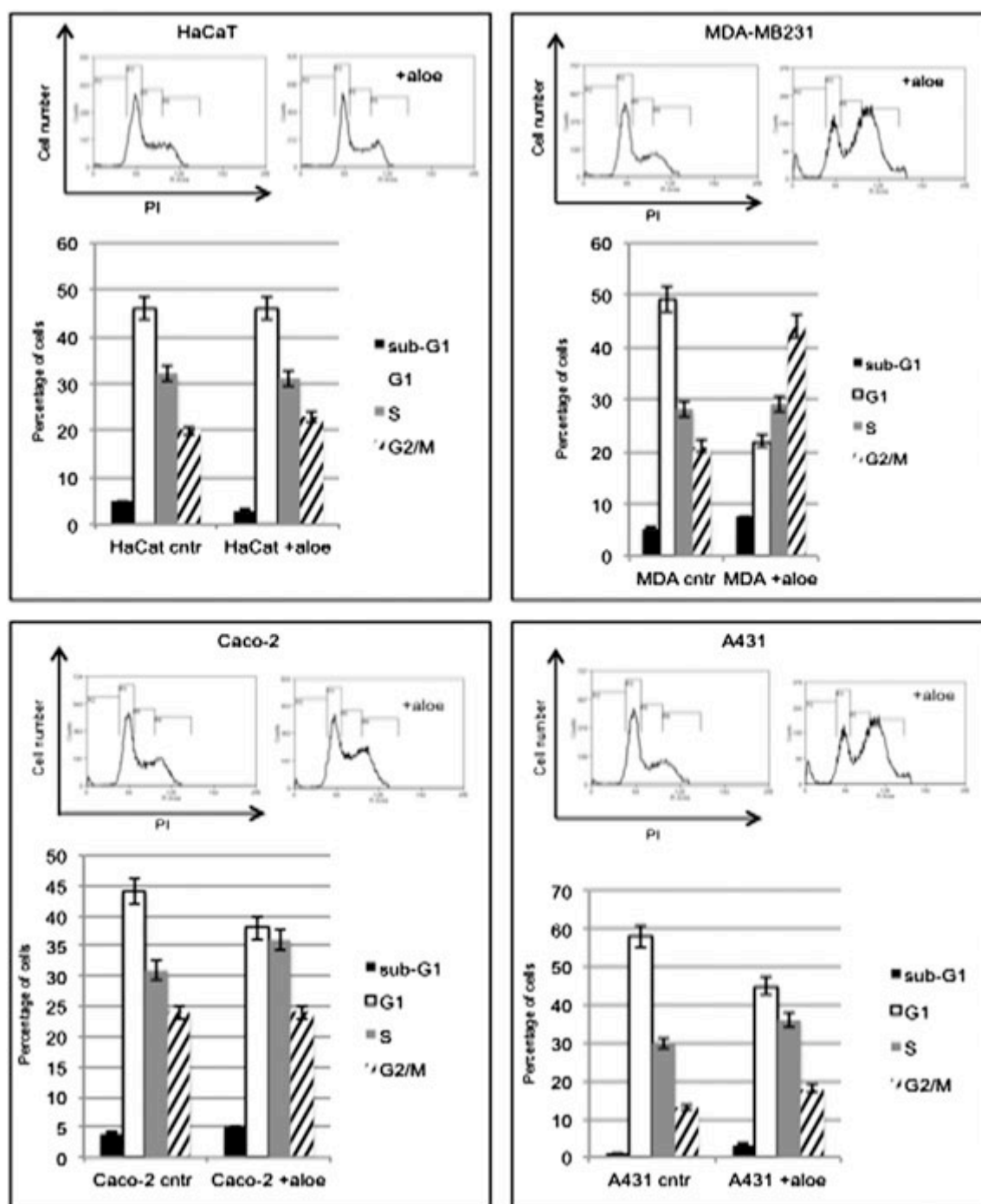


Figura 4.2: Dati rappresentativi ottenuti da analisi di citometria di flusso del ciclo cellulare di cellule HaCaT, MDA-MB231, Caco-2, e A-431 incubate con o senza Aloe per 48 h.

mentre le altre linee cellulari testate mostrano un aumento di cellule in fase S e/o G2/M con una diminuzione di compensazione di fase G0/G1 indicando che le cellule non erano in grado di riprendere il ciclo cellulare alla normale velocità delle fasi di transito. Inoltre, tranne i cheratinociti HaCaT, il trattamento con Aloe causa anche un aumento significativo della popolazione cellulare sub-G1. L'espressione di marcatori del ciclo cellulare p21WAF e ciclina D1 è stata studiata per esplorare anche l'effetto dell'Aloe a livello molecolare. Immunoblot con gli anticorpi appropriati mostrano che il trattamento con l'Aloe induce significativamente p21WAF in tutte le cellule tumorali testate, mentre l'espressione della CyclinD1 risulta inibita in cellule Caco-2 e MDA-MB231 (Fig. 4.1E e F). La Ciclina D1 è un fattore labile necessaria a livelli intracellulari elevati per consentire la progressione attraverso la fase G1 del ciclo cellulare. Il pathway mitogenico up-regola direttamente l'espressione della ciclina D1, quindi, la non induzione della Ciclina D1 con l'aumento concomitante di p21WAF è perfettamente in linea con l'incapacità delle cellule trattate con Aloe di riprendere efficacemente il ciclo cellulare. Inaspettatamente, Cellule A431 sembrano essere in grado di regolare l'espressione della ciclina D1 (Fig. 4.1G). Si può ipotizzare che il ritardo o il fallimento dell' induzione della ciclina D1 con il concomitante aumento di p21WAF potrebbe essere responsabile, almeno in parte, del massiccio distacco delle cellule A431 a 54 ore di trattamento con Aloe. È importante sottolineare che, anche se abbiamo osservato un aumentare delle

cellule in fase sub-G1 dopo trattamento con Aloe (Fig. 4.2), siamo stati in grado di osservare la scissione di PARP-1 tramite un'analisi di western blot indicando così che il trattamento Aloe non induce apoptosi. Il test dell'Annessina V ha confermato il risultato.

4.3.3 *L'aloe arborescens induce la differenziazione nei cheratinociti.*

Il concentrato di estratto di foglie di *Aloe arborescens* è stato utilizzato per centinaia di anni in applicazioni medicinali per accelerare il processo di riparo della pelle. Pertanto, abbiamo deciso di analizzare l'effetto dell'*Aloe arborescens* nel differenziamento di cheratinociti umani. Abbiamo paragonato il comportamento di cellule HaCaT (cheratinociti umani spontaneamente immortalizzati) che conservano la capacità di differenziare se trattate con determinate concentrazioni di Ca^{2+} , con quello di cheratinociti primari umani. L'aggiunta di calcio a colture di cheratinociti è lo stimolo più fisiologico per permettere l'avvio di un completo programma di differenziamento, inducendo non solo i marcatori biochimici ma anche molti dei cambiamenti strutturali che si osservano in vivo (Dotto, 1999). Per verificare se il profilo di differenziamento è alterato dal trattamento con Aloe, le cellule HaCaT sono state indotte a differenziare con l'aggiunta di calcio 1.2 mM in terreno di coltura privo di FBS, supplementato o meno con estratto di Aloe. Dopo 6 giorni di coltura, le cellule trattate con Aloe

presentavano dimensioni ridotte ed erano pluristratificate (fig. 4.3A). Per fornire un'evidenza sperimentale da un punto di vista molecolare che il differenziamento era stato anticipato con l'Aloe, è stato effettuato un immunoblot sul lisato cellulare totale proveniente da cellule trattate e non. In particolare, abbiamo osservato che **l'involucrina** e la **transglutaminasi II**, due dei marcatori del differenziamento terminale meglio caratterizzati (Paramio and Jorcano, 1997) erano espresse a livelli più alti nelle cellule trattate con Aloe. Al contrario, la proteina $\Delta Np63a$, che è associata con il potenziale differenziativo delle cellule epiteliali e che scompare nel differenziamento terminale dei cheratinociti (Di Costanzo et al., 2009), diminuiva più velocemente con il trattamento con Aloe (Fig. 4.3B). Nei cheratinociti primari umani (NHEK), il trattamento con Aloe ha determinato un drammatico aumento dell'espressione di involucrina, già evidente dopo un giorno di trattamento. In maniera simile a quanto osservato in cellule HaCaT, i livelli di $\Delta Np63a$ diminuiscono più velocemente in cheratinociti trattati con aloe che nel controllo (ovvero, in cellule non trattate) (Fig. 4.3C). Quindi, abbiamo indagato in maniera più approfondita circa l'effetto dell'Aloe durante le prime fasi di differenziamento delle cellule HaCaT. A questo scopo tali cellule sono state piastrate alla densità media di $2.5 \cdot 10^5$ in terreno completo supplementato o non con estratto di Aloe (1:10 v/v) e raccolte sia prima dell'aggiunta dello stesso (t_0) che dopo 6, 24, 30, 48, and 54 ore di trattamento. Uguali quantità di lisato cellulare sono stati analizzati

mediante immunoblot per rivelare i marcatori endogeni del ciclo cellulare p21WAF e la ciclina D1. Inoltre, anche Δ Np63a e la citocheratina 1 (CK1) sono stati monitorati come marcatori del differenziamento precoce. Come mostrato in fig. 4.3D, abbiamo inizialmente osservato un incremento del livello della ciclina D1 sia nei cheratinociti trattati che non. Tuttavia, in accordo con quanto osservato in cellule tumorali, la ciclina D1 tende ad essere repressa più velocemente in HaCaT trattate con Aloe, mentre p21WAF aumenta solo nelle cellule trattate con l'estratto. Dopo 54 ore di trattamento, la notevole diminuzione della ciclina D1 associata alla sostenuta espressione di p21Waf indica che i cheratinociti stanno anticipando il programma di differenziamento. Cheratinociti privi di p21WAF mostrano un aumento del potenziale proliferativo ed una drastica diminuzione dei marcatori del differenziamento (Di Cunto et al., 1998) indicando un coinvolgimento fondamentale di p21WAF nel controllo del differenziamento terminale. In linea con queste osservazioni, rispetto alle cellule di controllo, i cheratinociti trattati con Aloe hanno mostrato livelli più alti di p21WAF e CK1 in accordo con l'induzione del programma di differenziamento. Tuttavia, la persistenza della proteina Δ Np63a indica che entrambe le cellule trattate e non con Aloe non sono completamente differenziate (Fig. 4.3D) .

È noto che la ciclina D1 aumenta in seguito ad un segnale mitogenico, attraverso l'attivazione della via di segnalazione delle ERK's. Eccezionalmente, l'analisi mediante immunoblot dei lisati derivati da

cheratinociti HaCaT proliferanti e trattati per 24 ore con quantità crescenti di

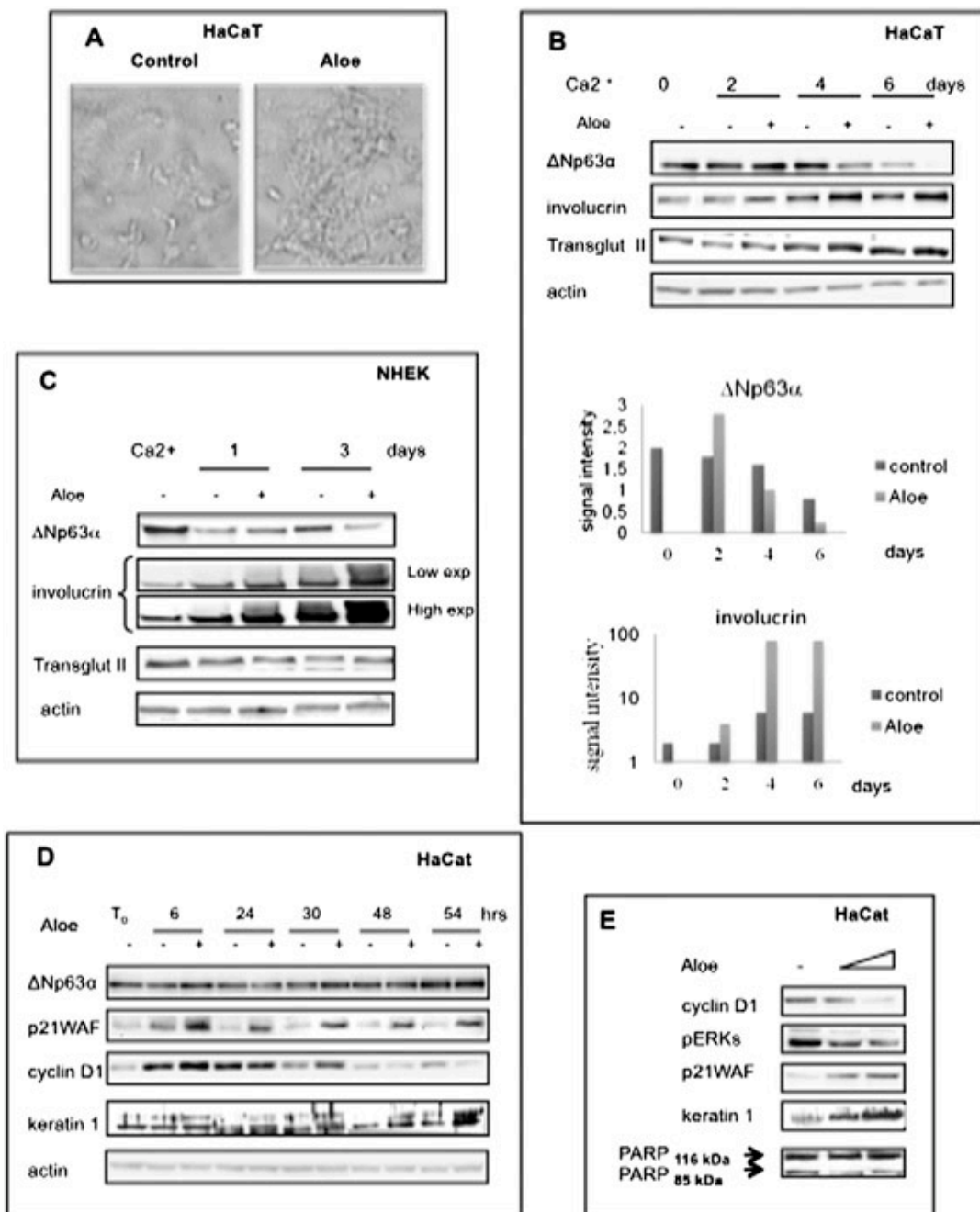


Figura 4.3: (A) cellule HaCaT confluenti sono state indotte a differenziare tramite il ritiro del siero e l'aggiunta di calcio (1,2 mM) nel mezzo di coltura di cellule DMEM integrato o meno con estratto di Aloe (1:10v/v). Dopo 6 giorni di coltura, le cellule trattate e non trattate sono state fissate con metanolo freddo e analizzate mediante microscopio a contrasto di fase. (B) cellule HaCaT differenziate e (C) NHEK in presenza o assenza di estratto di Aloe (1:10v/v) sono stati raccolti a diversi tempi indicati. Pari quantità di lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi di immunoblot con anticorpi contro ΔNp63α, involucrina, e transglutaminasi di tipo II. L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. (D) cellule HaCaT proliferanti sono state incubate in DMEM o DMEM contenente estratto di Aloe (1:10v/v). Cellule di controllo e trattate con Aloe sono state raccolte a 6, 24, 30, 48 e 54 h. (E) cellule HaCaT proliferanti sono state incubate in DMEM o DMEM contenente estratto di Aloe (20% o 50% v/v). Cellule di controllo e trattate con Aloe sono state raccolte a 24 h

estratto di *Aloe arborescens* (20% or 50% v/v) hanno mostrato che la diminuzione delle ciclina D1 e delle ERKs fosforilate, cosiccome l'induzione di p21WAF e della CK1, sono dose-dipendenti. Inoltre, il segnale proteico relativo al taglio della proteina PARP-1 non aumenta indicando quindi che le cellule non stanno andando in apoptosi (Fig. 4.3E).

Successivamente, abbiamo deciso di guardare l'effetto che il trattamento con Aloe ha sulle linee di carcinoma squamoso (SCC011 e SCC022). L'SCC è una crescita incontrollata ed anormale di cellule nello strato squamoso, che compone la maggior parte degli strati superiori della pelle. Le cellule SCC mantengono un elevato livello di Δ Np63a che è assolutamente fondamentale per la sopravvivenza degli stadi precoci del carcinoma squamoso. Innanzitutto, abbiamo valutato la velocità di proliferazione delle cellule SCC011 e SCC022 trattate con Aloe e non. Come mostrato in fig. 4.4AeB, entrambe le linee cellulari smettono di crescere in terreno di coltura contenente Aloe. Il profilo cellulare delle SCC022 trattate con Aloe rivela un drammatico incremento nella percentuale di cellule in subG1 alle spese delle cellule in G1 e G2/M (fig. 4.4C). Nelle SCC011 l'aumento delle cellule in subG1 è stato meno drammatico, sebbene l'arresto in fase S sia evidente (fig. 4.4D). Tale arresto della crescita è associato ad una caratteristica morfologia cellulare appiattita e allargata come mostrato nelle immagini di microscopia a fluorescenza delle SCC011 (fig.4.4E).

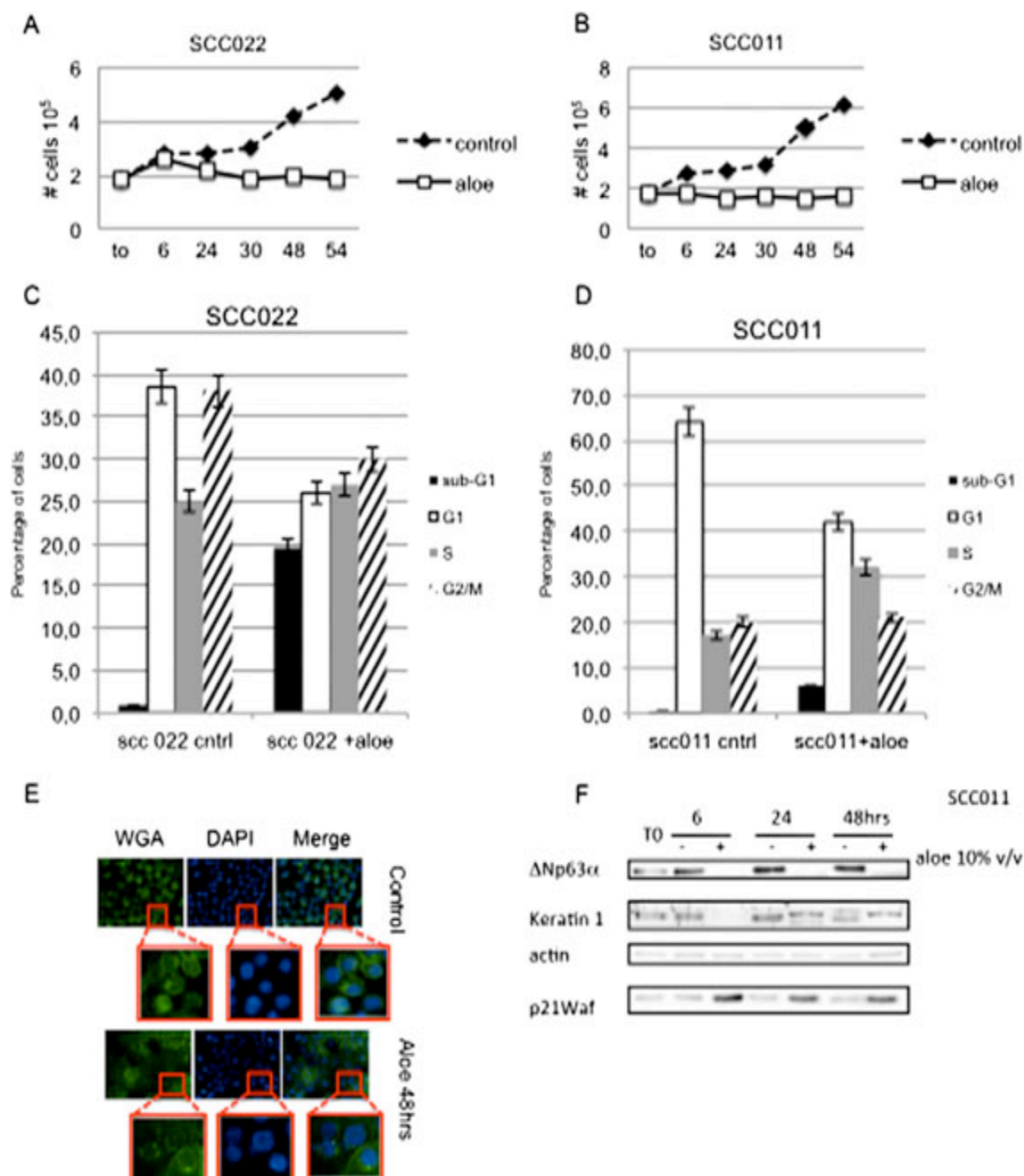


Figura 4.4: cellule proliferanti **(A)** SCC022 e **(B)** SCC011 sono state incubate in mezzo completo di coltura cellulare supplementate e non supplementate con estratto di Aloe (1:10v/v). Cellule di controllo e trattate con Aloe sono state raccolte a 6, 24, 30, 48 e 54h e contate in una camera di Burkner. **(C)** e **(D)** dati rappresentativi ottenuti tramite analisi di citometria a flusso del ciclo cellulare delle cellule SCC022 SCC011 incubate con o senza Aloe per 48 h. **(E)** Immagini rappresentative delle cellule SCC011 colorate con WGA (glicoproteine di membrana) o DAPI. **(F)** la stessa quantità di lisato cellulare è stata sottoposta ad analisi di immunoblot con anticorpi indicati. L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Questo dato è disponibile a colori all'indirizzo internet [wileyonlinelibrary.com / journal / ptr](http://wileyonlinelibrary.com/journal/ptr).

È stato interessante osservare che le SCC011 rispetto alle SCC022 mostrano un'attivazione più forte del marcatore di sopravvivenza cellulare Akt (dati non mostrati) che suggeriscono che Akt potrebbe interferire nella morte cellulare indotta dall'Aloe. Analisi di western blot di cellule SCC011 trattate e non con Aloe hanno mostrato una drammatica diminuzione di Δ Np63a e un concomitante aumento di p21WAF e dei polimeri di CK1 (fig.4.4F). A tal proposito è importante sottolineare, che dal momento che la proliferazione delle SCC011 e SCC022 è strettamente associata a Δ Np63a (Rocco et al., 2006), la consistente riduzione di Δ Np63a dovuta al trattamento con Aloe in queste cellule tumorali potrebbe essere la causa della morte cellulare osservata.

4.3.4 Test antibatterici.

L'estratto interno di foglie di *Aloe vera* ha mostrato la capacità di inibire la crescita delle specie di *Streptococcus* e *Shigella* in vitro (Arunkumar e Muthuselvam, 2009). È stato proposto che l'*emodina* dell'aloe abbia diretta attività antimicrobica. Per valutare se l'estratto acquoso di Aloe sia in grado di mostrare effetti antibatterici, sono stati effettuati due diversi saggi antibatterici su piastra con nove ceppi batterici differenti. Come primo test, piastre LB o MRS sono stati mescolate con ognuno dei ceppi batterici e una piccola quantità di estratto di Aloe è stata aggiunta sulla piastra solidificata. Come un secondo saggio, terreni di coltura agarizzati di LB o MRS contenenti varie quantità di estratto di Aloe sono stati "spottati" con aliquote di cellule batteriche

precedentemente coltivate in terreni liquidi. Con entrambi i saggi, nessuna inibizione della crescita batterica è stata osservata per qualsiasi dei nove ceppi batterici analizzati (dati non mostrati).

4.3.5 *Analisi proteomica.*

Sebbene l'estratto di *Aloe arborescens* sia stato largamente utilizzato per le sue proprietà antitumorali e immunostimolatorie, poco è conosciuto sul suo impatto nell'ambito del proteoma. Pertanto, abbiamo deciso di guardare ai cambiamenti a tale livello in seguito a trattamento con Aloe nei cheratinociti HaCaT. Estratti proteici totali derivanti da cellule HaCaT trattate (controllo) e non (campione) sono stati frazionati mediante elettroforesi bidimensionale e colorati con blue di Coomassie colloidale. Il gel è stato corso in triplicato e le corse confrontate utilizzando il software **ImageMaster 2D Platinum 6.0**. Sono stati fissati alcuni punti di riferimento iniziali per allineare correttamente i gel nella prima fase di analisi dell'immagine. Gli "spot" sono stati rilevati sui gel ed il software ha operato la sovrapposizione dei gel e degli spot corrispondenti. Tali spot rappresentano la stessa proteina nei diversi gel appaiati. Gli accoppiamenti sono stati determinati automaticamente utilizzando l'algoritmo per "gel matching" del software ImageMaster. Le differenti immagini di elettroforesi bidimensionale sono state confrontate mediante la visualizzazione sincronizzata degli spot

tridimensionali. Tra gli spot corrispondenti alle proteine sensibili al trattamento con Aloe, chiaramente rilevate in maniera riproducibile in tutte le corse elettroforetiche, ne sono stati selezionati 17 per l'analisi proteomica. L'analisi dell'immagine ha permesso l'identificazione di otto spot che erano presenti in maggiore quantità o esclusivamente nel campione trattato con Aloe, indicando in questo modo di essere indotti dal trattamento stesso. Nel campione di controllo, invece, sono stati rilevati 9 spot che non sono rilevabili o il cui segnale diminuisce dopo il trattamento con Aloe. Tali spot sono stati selezionati per l'identificazione mediante spettrometria di massa in seguito a sovrapposizione delle immagini analizzate. Le proteine escisse dal gel sono state ridotte, alchilate e digerite in situ con tripsina. La risultante miscela di peptidi è stata frazionata mediante nanoLC/MS/MS (cromatografia in liquido accoppiata a spettrometria di massa in tandem). In particolare, la miscela di peptidi è stata frazionata mediante nanoHPLC e sequenziata mediante spettrometria di massa in tandem, in grado di generare informazioni di sequenza per ciascuno dei peptidi. Gli spettri MS/MS sono stati utilizzati con il software MASCOT con la ricerca di sequenze non-ridondanti, traendo vantaggio dalla specificità del taglio proteolitico della tripsina e dall'appartenenza tassonomica del campione. Il numero delle masse misurate, che rientravano nell'ambito del parametro di accuratezza della massa data, sono state registrate e le proteine che avevano il più grande numero di corrispondenze di peptidi sono state esaminate portando

all'identificazione delle componenti della proteina stessa. Come ulteriore criterio di selezione, solo le proteine, identificate dalla ricerca di MASCOT con almeno due peptidi corrispondenti e trovate esclusivamente in tutti i replicati, sono state selezionate. La lista delle proteine identificate mediante questo approccio è illustrata in tabella 4.2.

Tabella 4.2. Elenco delle proteine differenzialmente rappresentate nelle cellule HaCaT di controllo o trattate con Aloe, identificate mediante spettrometria di massa

| Spot | MW | Score | Protein | Swissprot code | Peptides | Sequence coverage |
|---------|-------|-------|--|----------------|----------|-------------------|
| 1 | 72402 | 186 | 78 kDa glucose-regulated protein | P11021 | 8 | 20% |
| 2 | 50095 | 325 | Tubulin beta chain | P07437 | 11 | 34% |
| 3 | 11391 | 37 | Dermcidin | P81605 | 3 | 30% |
| 4 | 29843 | 60 | Prohibitin | P35232 | 6 | 25% |
| 5 | 22826 | 175 | Heat shock protein beta-1 | P04792 | 4 | 33% |
| 6 | 22436 | 53 | UMP-CMP kinase | P30085 | 4 | 42% |
| 7 | 23569 | 47 | Glutathione S-transferase P | P09211 | 6 | 42% |
| 8 | 17292 | 60 | Stathmin | P16949 | 2 | 18% |
| Control | | | | | | |
| Spot | MW | Score | Protein | Swissprot Code | Peptides | Sequence coverage |
| 9 | 62255 | 83 | Keratin, type I cytoskeletal 9 | P35527 | 5 | 10% |
| 10 | 71082 | 224 | Heat shock cognate 71 kDa protein | P11142 | 13 | 23% |
| 11 | 73920 | 49 | Stress-70 protein, mitochondrial | P38646 | 7 | 12% |
| 12 | 70294 | 68 | Heat shock 70 kDa protein 1A/1B | P08107 | 4 | 8% |
| 13 | 61187 | 492 | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | P10809 | 24 | 50% |
| 14 | 42052 | 156 | Actin, cytoplasmic 1 | P60709 | 9 | 34% |
| 15 | 32726 | 267 | Nucleophosmin | P06748 | 10 | 26% |
| 16 | 27871 | 189 | 14-3-3 protein sigma | P31947 | 9 | 37% |
| 17 | 16827 | 101 | Calmodulin | P62158 | 2 | 29% |

Tra le proteine identificate, un segnale corrispondente alla tubulina nel campione trattato mostra un incremento così come quello del potente peptide antibatterico conosciuto come Dermicidina (DCD). Questa osservazione è stata particolarmente interessante dato che non abbiamo riscontrato alcuna capacità antibatterica dell'estratto di *Aloe arborescens* contro diversi ceppi

batterici (vedi oltre). DCD è costitutivamente espressa nelle ghiandole sudoripare eccrine, è parte costitutiva della difesa innata della pelle umana e stimola i cheratinociti a produrre citochine e chemochine (Niyonsaba et al., 2009). Finora, non è stata riscontrata espressione di DCD nè a livello trascrizionale nè a livello proteico, in cheratinociti primari, fibroblasti, e melanociti nè in condizioni fisiologiche normali nè in seguito a stimolo con LPS, TNFalfa o TPA. Sebbene la capacità di stimolare la produzione di DCD da parte dell'Aloe necessiti di ulteriori indagini, la nostra osservazione fornisce un nuovo spunto nell'implicazione dell'Aloe nell'ambito della sua capacità microbica e dell'immunità della pelle. Il trattamento con Aloe inoltre induce l'espressione di molecole coinvolte in diversi aspetti della proliferazione e del differenziamento dei cheratinociti come GRP78, Proibitina e Statmina. Proibitina è una proteina potenziale soppressore di tumori che presenta la capacità di bloccare la crescita reprimendo la trascrizione dei geni mediata da E2F (Joshi et al., 2003). Statmina è una proteina che destabilizza i microtubuli e in associazione con la tubulina e l'HSP70, è stato riportato sia funzionalmente importante nel controllo di numerose vie di segnalazione che richiedono il riconoscimento dell'intero citoscheletro. GRP78 (conosciuta anche come HSRPA5) è stato visto aumentare negli strati sovrabasali dell'epidermide normale e può funzionare come chaperone molecolare in cooperazione con le HSPs, prendendo parte alla risposta di proteine non correttamente strutturate attivate durante il

differenziamento epidermico dei cheratinociti (Sugiura et al., 2009). In cellule HaCaT trattate con Aloe, le HSPs, essenziali per la sopravvivenza di cellule cancerose, erano poco rappresentate. Comunque, le HSPs sono presenti anche in condizioni non stressanti per le cellule semplicemente per monitorare il riciclo cellulare e la corretta strutturazione delle proteine. Ulteriori esperimenti sono necessari per chiarire questo fenomeno. Eccezionalmente, la Calmodulina e la citocheratina 1 sono state rilevate solo nel campione di controllo e scompaiono in seguito al trattamento con Aloe. Le restanti proteine hanno mostrato una sensibile diminuzione nel campione trattato con Aloe.

4.4 Conclusioni

I risultati presentati in questo studio indicano un chiaro effetto antiproliferativo di un estratto di Aloe su diverse cellule tumorali e un effetto pro-differenziativo sia su cheratinociti umani primari che immortalizzati. Per un punto di vista dell'applicazione medicinale, il nostro studio supporta l'uso di estratto di *Aloe arborescens* per il trattamento topico delle malattie iperproliferative della pelle o della pelle SCC. Esperimenti su animali in vivo saranno necessario per confermare ulteriormente il vantaggio dell'estratto proposto sulla salute.

4.5 Bibliografia

1. Arunkumar S, Muthuselvam M. 2009. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of Aloe vera L. against Clinical Pathogens. *World J Agric Sci* 5(5): 572–576.
2. Baccigalupi L, Di Donato A, Parlato M, et al. 2005. Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Res Microbiol* 156: 830–8365
3. Bedini C, Caccia R, Triggiani D, Mazzucato A, Soressi GP, Tiezzi A. 2009. Micropropagation of *Aloe arborescens* Mill: A step towards efficient production of its valuable leaf extracts showing antiproliferative activity on murine myeloma cells. *Plant Biosystems-an Int J Deal Aspects Plant Biol* 143(2): 233–240.
4. Di Costanzo A, Festa L, Duverger O, et al. 2009. Homeodomain protein Dlx3 induces phosphorylation-dependent p63 degradation. *Cell Cycle* 8(8): 1185–95.
5. Di Cunto F, Topley G, Calautti E, et al. 1998. Inhibitory function of p21Cip/Waf1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* 280: 1069–72.
6. Dotto P. 1999. Signal Transduction Pathway controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 442–457
7. Fakhry S, Manzo N, D'Apuzzo E, et al. 2009. Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res Microbiol* 160(10): 817–823.
8. Greathead H. 2003. Plants and plants extracts for improving animal productivity. *Proc Nutr Soc* 62: 279–290
9. Hochstrasser DF, Patchornik A, Merrill CR. 1988. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal Biochem* 173(2): 412–23.
10. Infascelli F, Tudisco R, Mastellone V, et al. 2010. Diet Aloe supplementation in pregnant buffalo cows improves colostrum immunoglobulin content. *Revista Veterinaria* 21(Suppl. 1): 151–153.
11. Joshi B, Ko D, Ordonez-Ercan D, Chellappan SP. 2003. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 312(2): 459–6.

12. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
13. Lefort K, Mandinova A, Ostano P, et al. 2007. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKa kinases. *Genes Dev* 21: 562–577.
14. Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, et al. 2009 A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In Vivo* 23(1): 171–5.
15. Naclerio G, Ricca E, Sacco M, De Felice M. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *B. cereus*. *Appl Environ Microbiol* 59: 4313–4316.
16. Niyonsaba F, Suzuki A, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. 2009. The human antimicrobial peptide dermicin activates normal human keratinocytes. *Br J Dermatol* 160(2): 243–249.
17. Paramio JM, Jorcano JL. 1997. Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human epidermal HaCaT cells. *Br J Dermatol* 137(1): 44–50.
18. Pecere T, Gazzola V, Mucignat C, et al. 2000. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 60: 2800–2804.
19. Rocco JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW. 2006. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 9(1): 45–56.
20. Sugiura K, Muro Y, Futamura K, et al. 2009. The unfolded protein response is activated in differentiating epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 129(9): 2126–35.
21. Vivo M, Di Costanzo A, Fortugno P, Pollice A, Calabrò V, La Mantia G. 2009. Downregulation of Δ Np63a in keratinocytes by p14ARF-mediated SUMO-conjugation and degradation. *Cell Cycle* 31: 8(21): 3537–3543.
22. Wessel D, Flugge UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138(1): 141–143.
23. Youngman P, Perkins JB, Sandman K. 1984. New genetic methods, molecular cloning strategies and gene fusion techniques for *Bacillus subtilis* which take advantage of Tn/ 917/ insertional mutagenesis. In Hoch JA, Ganesan AT (eds.). *Genetics and Biotechnology of Bacilli*. Academic Press: NY; 103–111.

Allegato 4

A Biochemical and Cellular Approach to Explore the Antiproliferative and Prodifferentiative Activity of *Aloe Arborescens* Leaf Extract

Blanda Di Luccia,¹ Nicola Manzo,¹ Maria Vivo,¹ Eugenio Galano,² Angela Amoresano,² Elvira Crescenzi,⁴ Alessandra Pollice,^{1*} Raffaella Tudisco,³ Federico Infascelli³ and Viola Calabrò¹

¹Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli 'Federico II', Naples, Italy

²Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli 'Federico II', Naples, Italy

³Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università di Napoli 'Federico II', Naples, Italy

⁴Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale, CNR, via S. Pansini, 580131, Naples, Italy

Aloe arborescens Miller, belonging to the *Aloe* genus (Liliaceae family), is one of the main varieties of *Aloe* used worldwide. Although less characterized than the commonest *Aloe vera*, *Aloe arborescens* is known to be richer in beneficial phytotherapeutic, anticancer, and radio-protective properties. It is commonly used as a pharmaceutical ingredient for its effect in burn treatment and ability to increase skin wound healing properties. However, very few studies have addressed the biological effects of *Aloe* at molecular level. The aim of the research is to provide evidences for the antiproliferative properties of *Aloe arborescens* crude leaf extract using an integrated proteomic and cellular biological approach. We analysed the composition of an *Aloe arborescens* leaf extract by gas chromatography-mass spectrometry analysis. We found it rich in Aloe-emodin, a hydroxylanthraquinone with known antitumoral activity and in several compounds with anti-oxidant properties. Accordingly, we show that the *Aloe* extract has antiproliferative effects on several human transformed cell lines and exhibits prodifferentiative effects on both primary and immortalized human keratinocyte. Proteomic analysis of whole cell extracts revealed the presence of proteins with a strong antiproliferative and antimicrobial activity specifically induced in human keratinocytes by *Aloe* treatment supporting its application as a therapeutical agent. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Aloe arborescens*; differentiation; proliferation.

Supporting information may be found in the online version of this article (Supplementary Material)

INTRODUCTION

Plants and their extracts are appreciated for their specific aroma, nutraceutical, and therapeutical properties, such as antimicrobial, antiproliferative, anti-inflammatory, immunostimulant, and antioxidative (Greathead, 2003). *Aloe arborescens* Miller, belonging to the *Aloe* genus (Liliaceae family), is one of the main varieties of *Aloe* used worldwide. It is commercially grown in South America (Brazil and Uruguay), South Africa and some Asian countries. The concentrated active extract from *Aloe arborescens* shares some therapeutical properties with the well-known and studied *Aloe vera* and is commonly used in medicinal applications to treat burn wounds and help accelerating the healing process of the skin. Recent studies have demonstrated that *Aloe arborescens* has immunostimulating activity in animal trials (Infascelli *et al.*, 2010), and it was found to have beneficial phytotherapeutic and anticancer properties (Lissoni *et al.*, 2009). It is known that the anticancer properties of *Aloe arborescens* depend not only on its immuno-modulatory effect, but also on a direct inhibition

of cancer cell proliferation (Bedini *et al.*, 2009). Immunostimulatory effects are due to acemannan, while antiproliferative effects have been ascribed to anthracenic, anthraquinonic, and aloenin-like compounds (Lissoni *et al.*, 2009). *Aloe arborescens* is also known for its effective burn treatment and ability to increase skin wound healing properties. Furthermore, it has been shown to be useful in reducing microbial growth and to kill a broad range of viruses and fungi, thereby providing extraordinary support for the gastrointestinal tract, mucous membranes, and connective tissue (Falcetti A., personal communications).

To determine the therapeutic effects of *Aloe arborescens*, a considerable number of clinical investigations have been done; however, very few studies have addressed the biological effects of *Aloe* at molecular level. The aim of the present study is to analyse the cellular response to treatment with *Aloe arborescens* crude leaf extract through a biochemical and cellular approach in order to support its application as a therapeutical agent.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the whole-leaf extract. Plants from Italian farms (Marsala, Sicily) certified for organic systems were cultivated in natural habitat and

* Correspondence to: Dr Alessandra Pollice, PhD, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli, 'Federico II', Via Cinzia, Monte S Angelo, 80126 Napoli, Italy.
E-mail: apollice@unina.it

harvested when they were older than 4 years. The leaves were washed in tanks, laid in plastic bags, successively washed at 25°C and brushed in order to eliminate external impurity. After air drying, the leaves were submitted to a 'cold method' provided by HDR sas (Caserta, Italy) which allows to extract the active principles either from the inner part or from the cuticle. Commercial preparation of *Aloe* extract was stabilized by potassium sorbate and citric acid. Successively, the extract was stored in stainless still containers which were sealed to avoid air contact.

Cell culture and *Aloe arborescens* treatment. NHEK primary cells, derived from neonatal foreskin, were from Clonetics (San Diego, California). The HaCaT (human spontaneously immortalized keratinocyte) and MDA-MB231 (human breast adenocarcinoma) cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. The keratinocyte-derived squamous carcinoma cell lines (SCC011 and SCC012) were previously described (Lefort *et al.*, 2007). The A431 (human epidermoid carcinoma) cell line was maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. All cell lines were cultured at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂. Aliquots of *Aloe arborescens* fresh leaf extract were centrifuged at 10000 rpm for 10 min and sterilized using disposable Millex syringe filter units, pore size 0.22 µm (Millipore). Sterile extract was employed for the treatment at 10, 20, and 50% v/v, as indicated, in cell culture medium. Equal amounts of *Aloe* preservation medium were added to control samples. *Aloe*-treated and untreated cells were photographed and harvested for Western-blot analysis as described below.

Cell growth analysis. HaCaT spontaneously immortalized human keratinocytes, MDA-MB231 metastatic breast adenocarcinoma, A431 human epidermoid carcinoma, CaCo2 human epithelial colorectal adenocarcinoma cells, SCC011, and SCC022 squamous cell carcinoma (SCC) were plated in 35 mm dishes, at a cell density of 1×10^5 cells/plate. Cells were cultured in complete growth media supplemented or not with aliquots of fresh *Aloe arborescens* extract (10% v/v) for 6, 24, 30, 48, and 54 h collected, and counted in a Burkert chamber. Cell extracts from treated and untreated cells were prepared and subjected to SDS-PAGE and immunoblot for gene-expression analysis.

Flow cytometry analysis. After treatments, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and harvested with 0.05% trypsin in 0.15% Na₂EDTA. Cells were then centrifuged, washed in PBS, fixed with ice-cold 70% ethanol, and stored overnight at 4°C. Fixed cells were washed in PBS and then incubated with propidium iodide (50 µg/ml) and RNase A (10 µg/ml) for 30 min at room temperature. Data acquisition was performed using a CyAn ADP Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Milano, Italy) and Summit Software.

Keratinocyte differentiation. Non tumorigenic HaCaT cells were chosen because they retain the ability to differentiate upon Ca²⁺ treatment thus representing an intermediary between normal and cancerous keratinocytes. HaCaT cells were grown to confluence in complete

growth medium and switched into differentiation medium (serum-free DMEM) with 1.2 mM CaCl₂ with or without *Aloe extract* (10% v/v) for 6 days according to (Vivo *et al.*, 2009), with the exception that the medium was changed every 48 h. Differentiated cells treated or not with *Aloe* were photographed and harvested for SDS-PAGE and immunoblot analysis as described below. NHEK cells were propagated in serum-free keratinocyte growth medium containing 0.05 mM calcium. NHEK cells with 70%–80% cell confluency were switched to high-calcium medium (1.2 mM) to induce differentiation. Extracts from *Aloe*-treated or untreated NHEK cells were then subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis as described below.

SDS-PAGE and immunoblot analysis. *Aloe arborescens* treated and untreated cells were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% sodium deoxycholate, and protease inhibitors). Cell lysates were incubated on ice for 40 min, and the extracts were centrifuged at 13200 rpm for 15 min to remove cell debris. Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad). After the addition of 2× Laemmli buffer (SIGMA), the samples were boiled at 100°C for 5 min and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). The PVDF membrane was blocked in 5% w/v milk buffer (5% w/v non-fat dried milk, 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0.2% Tween 20) and incubated with primary antibodies diluted in 5% w/v milk or bovine serum albumine buffer for 2 h at room temperature or overnight at 4°C. Primary antibodies were anti-mouse p63-4A4 (Calbiochem), anti-mouse involucrin (Abcam antibody), anti-mouse cytokeratin 1 (Santa-Cruz biotechnology), anti-rabbit transglutaminase type 2 (Abcam antibody), anti-rabbit pErk42/44 (Cell signalling), anti-rabbit p21 (Santa-Cruz biotechnology), anti-rabbit cyclin D1 (Cell Signalling), anti-rabbit PARP-1 (Cell Signalling), and anti-goat β-actin (Santa-Cruz biotechnology). Data were visualized by enhanced chemiluminescence method (GE-Healthcare) using HRP-conjugated secondary antibodies (Santa-Cruz biotechnology) incubated for 1 h at room temperature and analysed by Quantity One[®] software of ChemiDoc[™]XRS system (Bio-Rad).

Cell fluorescent staining. SCC011 and SCC022 cells were seeded on sterile coverslips and treated or not with *Aloe arborescens* extract (10% v/v) for 48 h. After the treatment, three washes with PBS were performed, and cells were fixed with 4% paraformaldehyde at RT for 15 min. Then, cells were incubated with Wheat Germ Agglutinin (WGA) membrane fluorescent stain (1:200) for 1 h at 37°C. After three washes with PBS, cells were permeabilized with 0.5% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, Selze/Germany) at room temperature for 5 min. Following permeabilization, cells were incubated with DAPI (1:10000) for 3 min at RT. After three washes with 0.05% PBS-Tween, slides were mounted and analysed.

Metabolite analysis. Aliquots of commercial preparation of aloe extract were submitted to liquid-liquid extraction procedure by using equal amount of chloroform (1:1 v/v). The extraction step was performed three times, and the

organic extracts were collected and dried. Analyte mixtures were finally trimethylsilylated in 200 μ l of N, O-bis(trimethylsilyl) acetamide at 80°C for 45 min. The sample was dried down under nitrogen, dissolved in 50 μ l of hexane, and centrifuged to remove the excess of solid reagents. The hexane supernatant (1/50) was used for the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis.

GC-MS analysis. GC-MS analyses were performed on a 5390 MSD quadrupole mass spectrometer (Agilent technologies) equipped with a gas chromatograph by using a DB-5MS fused silica capillary column (30 m, 0.5 mm ID, 0.25 μ m ft) from G&W. The injection temperature was 250°C. For lipid analyses, the oven temperature was increased from 25°C to 90°C in 1 min and held at 90°C for 1 min before increasing to 140°C at 25°C/min, to 200°C at 5°C/min and finally to 300°C at 10°C/min. Electron Ionization mass spectra were recorded by continuous quadrupole scanning at 70 eV ionization energy. Each species was interpreted on the basis of electron impact spectra (NIST library and Analyst Software).

Two-dimensional electrophoresis (2DE). The first dimensional electrophoresis (isoelectric focusing, IEF) was carried out on non-linear wide-range immobilized pH gradients (pH 4–7; 7 cm long IPG strips; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and achieved using the Ettan IPGphor system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). 200 μ g of protein extracts was precipitated with methanol/chloroform according to (Wessel and Flugge, 1984) and solubilized in 125 μ l of rehydration buffer and 0.2% (v/v) carrier ampholyte for 12 h, at 50 mA, at 20°C. The strips were then focused according to the following electrical conditions at 20°C: 500 V for 30 min, 1000 V for 30 min, 5000 V for 10 h, until a total of 15000 Vt was reached. After focusing, analytical and preparative IPG strips were equilibrated for 15 min in 6 M urea, 30% (V/V) glycerol, 2% (w/V) SDS, 0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 1% (w/V) dithiothreitol (DTT), and subsequently for 15 min in the same urea/SDS/Tris buffer solution but substituting the 1% (w/V) DTT with 2.5% (w/V) iodoacetamide. The second dimension was carried out on 12.5% (w/w) polyacrylamide gels (10 cm \times 8 cm \times 0.75 mm) at 25 mA/gel constant current and 10°C until the dye front reached the bottom of the gel, according to (Laemmli, 1970; Hochstrasser *et al.*, 1988). MS-preparative gels were stained overnight with colloidal Coomassie Brilliant Blue and destained with MilliQ grade water.

Image analysis. Gels images were acquired with an Epson expression 1680 PRO scanner. Computer-aided 2-D image analysis was carried out using the ImageMasterTM 2D Platinum software. Relative spot volumes (%V) (V = integration of OD over the spot area; %V = V single spot/V total spot) were used for quantitative analysis in order to decrease experimental errors.

In situ digestion. Trypsin, DTT, iodoacetamide, and R-cyano-4-hydroxycinnamic acid were purchased from Sigma. NH_4HCO_3 was from Fluka. Trifluoroacetic acid-high-performance liquid chromatography (HPLC) grade was from Carlo Erba. All other reagents and solvents were of the highest purity available from Baker. Analysis was performed on the Coomassie blue-stained spots

excised from the gels. The spots were excised from the gel and destained by repetitive washes with 0.1 M NH_4HCO_3 , pH 7.5, and acetonitrile. Samples were reduced by incubation with 50 μ l of 10 mM DTT in 0.1 M NH_4HCO_3 buffer, pH 7.5 and carboxyamidomethylated with 50 μ l of 55 mM iodoacetamide in the same buffer. Enzymatic digestion was carried out with trypsin (12.5 ng/ μ l) in 10 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8. Gel pieces were incubated at 4°C for 2 h. Trypsin solution was then removed, and a new aliquot of the same solution was added; samples were incubated for 16 h at 37°C. A minimum reaction volume was used as to obtain the complete rehydration of the gel. Peptides were then extracted by washing the gel particles with 10 mM ammonium bicarbonate and 1% formic acid in 50% acetonitrile at room temperature. The resulting peptide mixtures were filtrated using 0.22 PDVF filter from Millipore, following the recommended procedure.

NanoHPLC-chip MS/MS analysis. The peptide mixtures were analysed using a CHIP MS 6520 QTOF equipped with a capillary 1200 HPLC system and a chip cube (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca). After loading, the peptide mixture (8 μ l in 0.1% formic acid) was first concentrated and washed at 4 μ l min⁻¹ in 40 nl enrichment column (Agilent Technologies chip), with 0.1% formic acid in 2% acetonitrile as eluent. The sample was then fractionated on a C18 reverse-phase capillary column (75 μ m \times 43 mm in the Agilent Technologies chip) at flow rate of 400 nl min⁻¹ with a linear gradient of eluent B (0.1% formic acid in 95% acetonitrile) in A (0.1% formic acid in 2% acetonitrile) from 7 to 60% in 50 min.

Peptide analysis was performed using data-dependent acquisition of one MS scan (mass range from 400 to 2000 m/z) followed by MS/MS scans of the three most abundant ions in each MS scan. The acquired MS/MS spectra were transformed in Mascot generic file format and used for peptides identification with a licensed version of MASCOT 2.1, in a local database (Swiss Pro).

Protein identification. Raw data from nano-LC-MS/MS were analysed using Qualitative Analysis software, and MSMS spectra were searched against non-redundant protein databases (NCBI nr 20090924, 9760158 sequences) and UniprotSwissprot (2011, 167910 sequences), with the taxonomy restriction to Homo sapiens, using in-house MASCOT 2.1 software (Matrix Science, Boston, USA).

The Mascot search parameters were: 'trypsin' as enzyme allowing up to three missed cleavages, carbamidomethyl on as fixed modification, oxidation of M, pyroGlu N-term Q, as variable modifications, 20 ppm MSMS tolerance, and 0.6 Da peptide tolerance. The score used to evaluate quality of matches for MSMS data was higher than 32.

Phase-contrast microscopy. HaCaT and A431 cells were grown and (HaCaT) induced to differentiate on glass coverslips in six-well plates, washed with PBS and fixed with cold methanol for 10 min. Treated and not-treated cells were photographed (40 \times) with Olympus BX51 microscope.

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains used in this study were *Bacillus cereus* (6A2) (Naclerio *et al.*, 1993), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocitogenes* (ATCC 7644), *Salmonella typhimurium*

(ATCC 14028), *Shigella sonnei* (ATCC25931), *Escherichia coli* (DH5 α), *Bacillus subtilis* (PY79) (Youngman *et al.*, 1984), *Lactobacillus mucosae* (SF1031), and *Lactobacillus gasseri* (SF1109) (Fakhry *et al.*, 2009). Lactobacilli cultures were cultured in MRS broth (Difco) at 37°C in microaerophilic conditions, while for all other strains, LB medium (8 g/l NaCl, 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract) and aerobic conditions at 37°C were used. *Aloe*-containing liquid media, obtained by adding 2 ml of an aqueous *Aloe* leaf extract to 8 ml of LB or MRS media, were inoculated with 0.1 ml of an overnight culture and growth at 37°C followed for 8–12 h by spectrophotometer (OD₆₀₀) analysis.

Plate antibacterial assays. For each indicator strain utilized, 100 μ l aliquots of exponential growth cultures was mixed with 10 ml of LB or MRS soft agar (0.7%). Plates were then spotted with 10 μ l of *Aloe arborescens* extract, incubated at 37°C and the inhibition halo measured as previously reported (Baccigalupi *et al.*, 2005). The effects of *Aloe arborescens* extracts on bacterial growth were also measured on LB and MRS agar plates prepared by adding various dilutions of *Aloe* extract (1:1, 1:5, 1:10) to the media and then spotting on the solidified plates aliquots (10 μ l) of each bacterial culture in stationary growth phase. *Aloe*-containing plates were then incubated 37°C and checked for bacterial growth after 24 and 48 h.

RESULTS AND DISCUSSION

GC-MS analysis

The composition of the *Aloe arborescens* preparation was determined by GC-MS analyses following liquid–

liquid extraction of different analytes from the extract. The extracted mixture of species was derivatized to TMS derivatives and directly analysed by GC-MS by monitoring the total ion current as a function of time. Each species was univocally identified on the basis of the electron impact fragmentation spectra. All the analyses were performed as triplicates. The chromatograms of organic phase extracted in chloroform essentially revealed the presence of hesenoic (C₆H₁₂O₂), sorbic (C₆H₈O₂), and benzoic acid (C₆H₈O₂). In the aqueous phase, 22 predominant species were identified and are listed in Table 1. Aloin, one of the main component of *Aloe* species with known pharmacological activities, was not detected, while a significant amount of Aloe-emodin, a hydroxylanthraquinone having specific antineuroectodermal tumor activity (Pecere *et al.*, 2000), was present (14%).

Aloe arborescens affects cancer cell proliferation

It is already known that *Aloe arborescens* has antiproliferative and anticancer effects (Lissoni *et al.*, 2009; Bedini *et al.*, 2009); however, the molecular mechanisms underlying the cellular response to *Aloe* treatment remains to be defined. This prompted us to analyse the effect of an *Aloe arborescens* leaf extract on cell proliferation at cellular and molecular level, by comparing the rate of cell proliferation, the cell-cycle distribution, and the expression of cell-cycle-related molecular markers in *Aloe*-treated and untreated human cells. These analyses were performed in A431 (epidermoid skin carcinoma), MDA-MB231 (metastatic breast cancer), CaCo-2 (epithelial colorectal adenocarcinoma), and HaCaT spontaneously immortalized keratinocytes. As shown in Fig. 1, we reproducibly

Table 1. List of species identified by GC-MS in the *Aloe arborescens* commercial preparation. The relative abundance is expressed as percentage of total volume injected. Preservatives are indicated in bold.

| Peak N° | Retention time (min) | Compound | Molecular formula | % of total |
|---------|----------------------|---|--|--------------|
| 1 | 4.28 | Sorbic acid | C₆H₈O₂ | 3.88 |
| 2 | 5.00 | Benzoic acid | C ₇ H ₆ O ₂ | 10.95 |
| 3 | 5.16 | Phosphoric acid | H ₃ PO ₄ | 9.27 |
| 4 | 5.76 | Succinic acid | C ₄ H ₆ O ₄ | 11.67 |
| 5 | 6.17 | Itaconic acid | C ₅ H ₆ O ₄ | 0.27 |
| 6 | 7.54 | Octanoic acid | C ₈ H ₁₆ O ₂ | 0.10 |
| 7 | 8.68 | Malic acid | C ₄ H ₆ O ₅ | 0.06 |
| 8 | 9.19 | 4-hydroxycyclohexylcarboxylic acid | C ₇ H ₁₂ O ₃ | 1.76 |
| 9 | 10.08 | Rythronic acid | C ₁₆ H ₄₀ O ₅ Si ₄ | 0.08 |
| 10 | 10.58 | α -hydroxycinnamic acid | C ₉ H ₁₀ O ₃ | 0.11 |
| 11 | 12.01 | Pimelic acid | C ₇ H ₁₂ O ₄ | 0.35 |
| 12 | 13.17 | Isocitric acid lactone | C ₆ H ₆ O ₆ | 0.39 |
| 13 | 13.50 | Cyclooctene-1,2-diol | C ₈ H ₁₄ O ₂ | 0.21 |
| 14 | 13.71 | Tricarballic acid | C ₆ H ₈ O ₆ | 0.96 |
| 15 | 14.21 | para-Coumaric acid | C ₉ H ₈ O ₃ | 0.38 |
| 16 | 14.72 | Terephthalic acid | C ₈ H ₆ O ₄ | 0.08 |
| 17 | 15.27 | Citric acid | C₆H₈O₇ | 44.74 |
| 18 | 16.37 | Ferulic acid | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 0.15 |
| 19 | 17.11 | 2,4,6-tri-tert-butylphenol | C ₁₈ H ₃₀ O | 0.24 |
| 20 | 18.34 | Palmitic acid | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 0.10 |
| 21 | 19.92 | 1H-Indole-2,3-dione-6-ethoxy | C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₅ | 0.08 |
| 22 | 22.26 | 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione (Aloe-emodin) | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 14.01 |

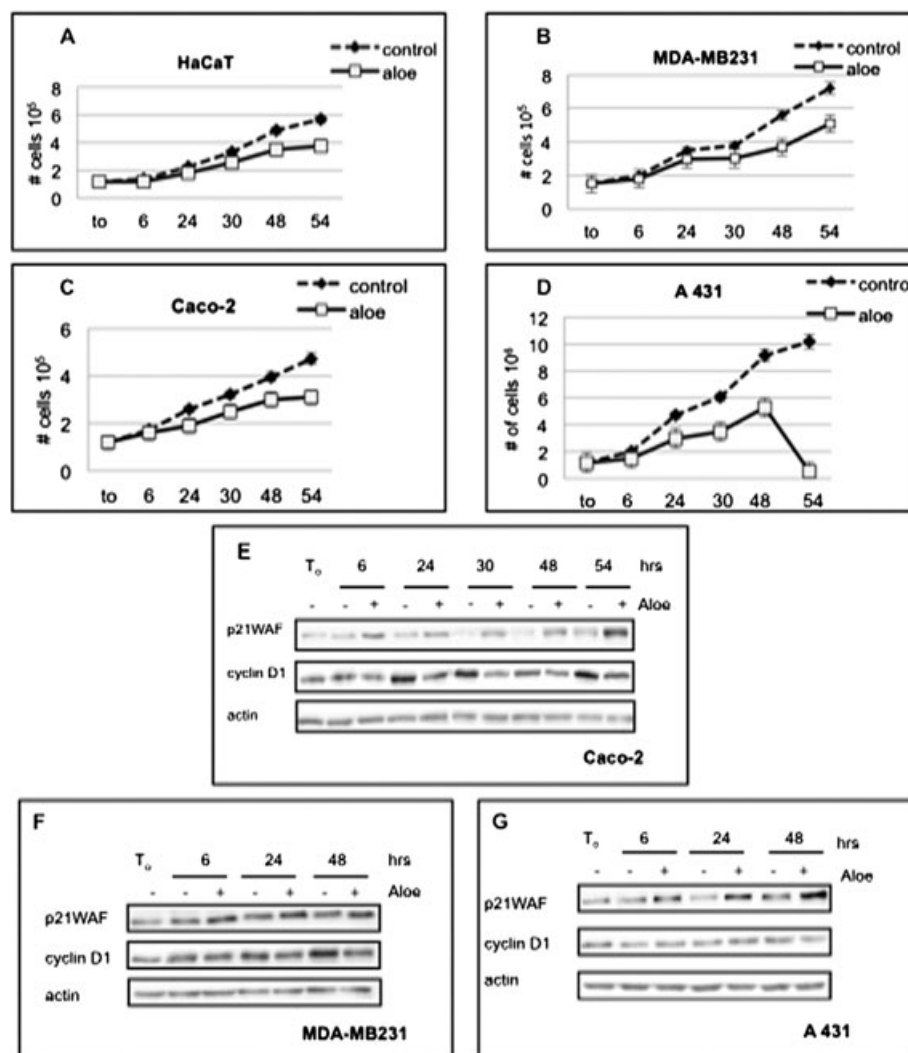


Figure 1. (A) Proliferating HaCaT, (B) MDA-MB231, (C) CaCo-2, (D) A431 cells were incubated in complete cell culture medium supplemented or not with *Aloe* extract (1:10 v/v). Control and *Aloe*-treated cells were collected at 6, 24, 30, 48, and 54 h and counted in a Burkert chamber. (E) Proliferating CaCo-2, (F) MDA-231, (G) A431 cells were incubated in complete cell culture medium supplemented or not with *Aloe* extract (1:10 v/v). Control and *Aloe*-treated cells were harvested at indicated different times (h). Equal amount of cell lysates was subjected to immunoblot analysis with antibodies against cyclin D1 and p21WAF. Actin was used as a loading control.

found that *Aloe* extract reduces the cell proliferation rate in all cell lines tested. At 54 h of exposure to *Aloe*, a 30 to 40% reduction in the number of cells was observed in MDA-MB231, CaCo2, and HaCaT cells, while A431 cells stopped to proliferate and underwent a drastic massive cell death (Fig. 1D). The cell-cycle distribution of control and *Aloe*-treated cells by flow cytometry shows that HaCaT cells display only a slight increase (3%) in the percentage of G2/M cells after 48 h of *Aloe* treatment (Fig. 2), while the other cell lines tested display an increase of cells in S and/or G2/M phase with a compensatory decrease of G0/G1 phase population indicating that cells were unable to resume the cell cycle at normal phase transit rate. Moreover, except for HaCaT keratinocytes, *Aloe* treatment also caused a significant increase in sub-G1 cell population.

Expression of the cell-cycle markers p21WAF and Cyclin D1 was also investigated to explore *Aloe* effect at the molecular level. Immunoblots with the appropriate antibodies show that *Aloe* treatment significantly induced p21WAF in all tumor cells tested, while Cyclin D1 expression was inhibited in CaCo-2 and MDA-MB231 cells (Fig. 1E and F). Cyclin D1 is a labile factor required at high level for progression through the G1 phase of the cell

cycle. Mitogenic pathways directly up-regulate the expression of Cyclin D1; therefore, impaired induction of Cyclin D1 with the concomitant increase of p21WAF is perfectly in line with the ineffectiveness of *Aloe*-treated cells to efficiently resume the cell cycle. Unexpectedly, A431 cells seemed to be unable to regulate Cyclin D1 expression (Fig. 1G). We can speculate that the delay or failure of Cyclin D1 induction with the concomitant increase of p21WAF might be responsible, at least in part, for the massive A431 cell detachment at 54 h of *Aloe* treatment. Importantly, although we observed an increase of sub-G1 cells upon *Aloe* treatment (Fig. 2), we were unable to observe PARP-1 cleavage by western blot analyses (see Supplementary Fig. 1a) thereby indicating that *Aloe* treatment was not inducing apoptosis. Annexin V assay confirmed the result (see Supplementary Fig. 1b).

***Aloe arborescens* induces keratinocyte differentiation**

The concentrated leaf extract from *Aloe arborescens* plants has been used for hundreds of years in medicinal applications to help accelerating the healing process of

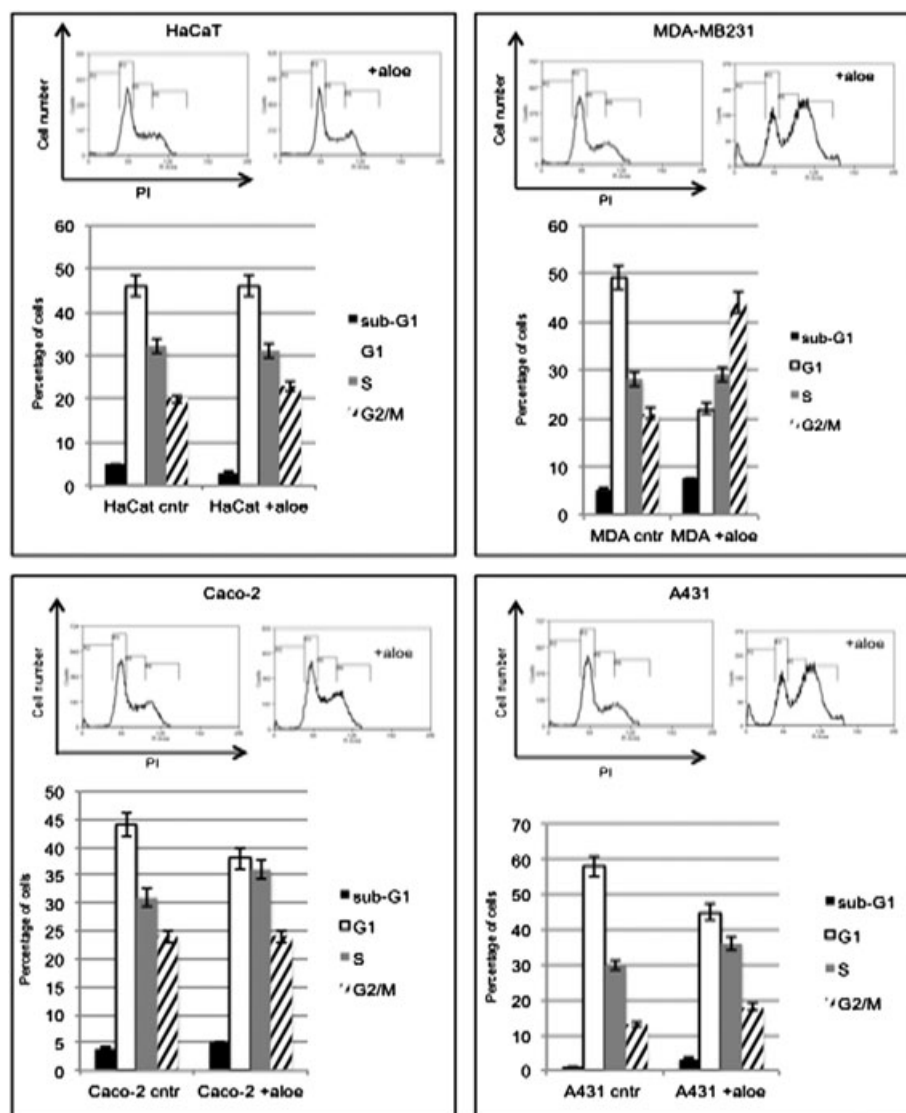


Figure 2. Representative data obtained from flow-cytometric analysis of cell cycle of HaCaT, MDA-MB231, CaCo-2, and A-431 cells incubated with or without *Aloe* for 48 h.

the skin. Therefore, we decided to analyse the effect of *Aloe arborescens* on differentiation of human keratinocytes. We decided to compare the behavior of HaCaT cells (spontaneously immortalized human keratinocytes) that retain the ability to differentiate upon Ca^{2+} treatment with that of human primary keratinocytes. Addition of calcium to keratinocyte cultures is the most physiological stimulus to elicit a rather complete differentiation program, inducing not only biochemical markers but also many of the structural changes occurring *in vivo* (Dotto, 1999). To check whether the differentiation profile is altered by *Aloe* treatment, HaCaT cells were induced to terminally differentiate by adding 1.2 mM calcium in a serum-free medium, supplemented or not with *Aloe* extract. After 6 days of culture, *Aloe*-treated cells became shrunk and pluristratified (Fig. 3A). To provide molecular evidence that differentiation was anticipated by *Aloe* treatment, we performed immunoblot analyses on extracts derived from treated and untreated cells. In particular, we observed that Involucrin and Transglutaminase, two well-characterized differentiation markers (Paramio and Jorcano, 1997), were expressed at higher levels in *Aloe*-treated cells. Conversely, $\Delta\text{Np63}\alpha$ that is

associated with the proliferative potential of epithelial cells and disappears in terminally differentiated keratinocytes (Di Costanzo *et al.*, 2009) was down-regulated earlier upon *Aloe* treatment (Fig. 3B).

In human primary keratinocytes (NHEK), *Aloe* treatment caused a dramatic increase of Involucrin gene expression that was already evident after 1 day of treatment. Similar to what we have observed in HaCaT cells, $\Delta\text{Np63}\alpha$ level decreased faster in *Aloe*-treated keratinocytes compared with control cells (Fig. 3C).

We then looked more deeply into the effect of *Aloe* treatment during the early phases of HaCaT cell differentiation. To this purpose, HaCaT cells were seeded at medium density (2.5×10^5) in complete medium supplemented or not with *Aloe* extract (1:10 v/v) and collected before *Aloe* addition (t0) or after 6, 24, 30, 48, and 54 h after *Aloe* treatment (Fig. 3D). Equal amounts of cell lysates were subjected to immunoblot analysis to detect endogenous p21WAF and Cyclin D1. $\Delta\text{Np63}\alpha$ and Cytokeratin 1 (CK1) were also monitored as early differentiation markers. As shown in Fig. 3D, we initially observed an increase of Cyclin D1 protein levels both in *Aloe*-treated and untreated keratinocytes. However,

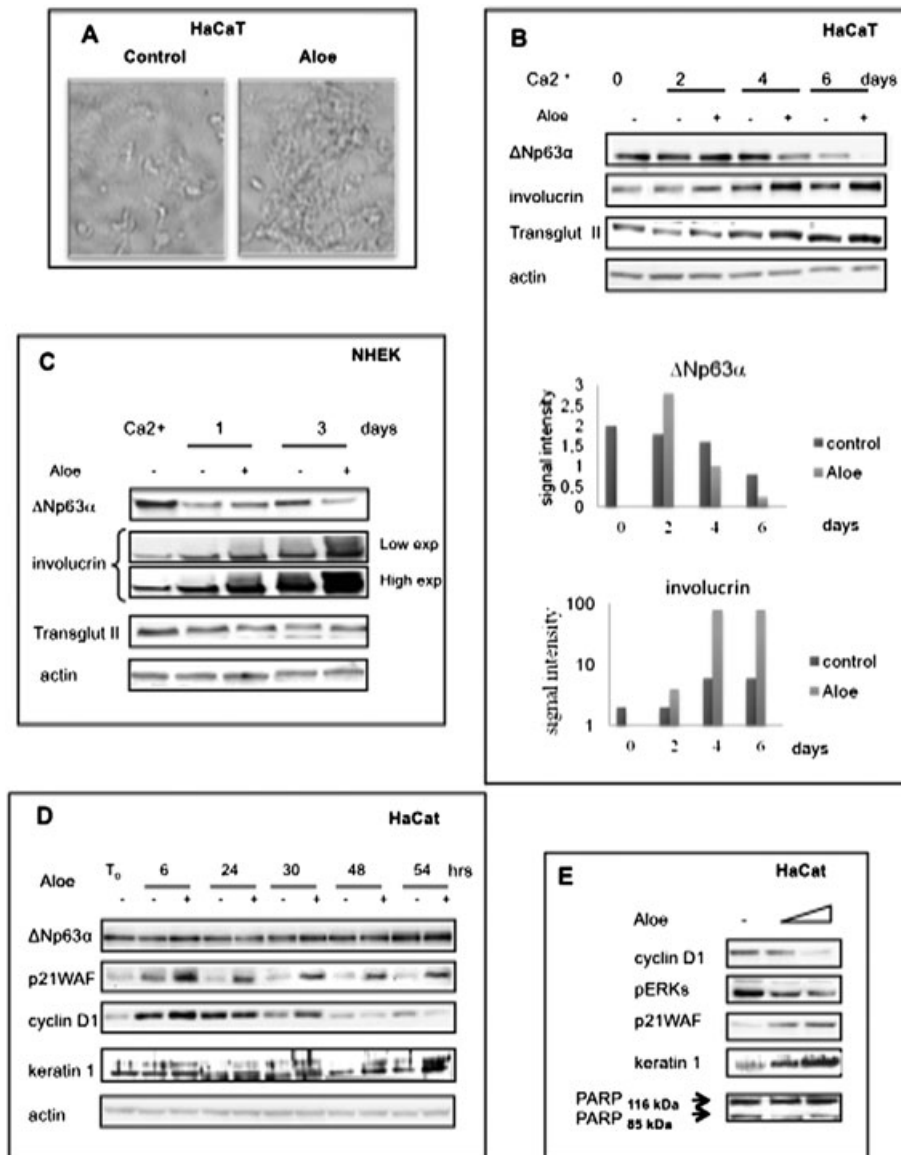


Figure 3. (A) Confluent HaCaT cells were induced to terminally differentiate by serum withdrawal and calcium addition (1,2 mM) in DMEM cell culture media supplemented or not with Aloe extract (1:10 v/v). After 6 days of culture, treated and non-treated cells were fixed with cold methanol and analysed by phase-contrast microscopy. (B) Differentiated HaCaT and (C) NHEK cells in presence or absence of *Aloe* extract (1:10 v/v) were collected at different indicated times. Equal amount of cell lysates was subjected to immunoblot analysis with antibodies against ΔNp63α, involucrin, and transglutaminase type II. Actin was used as a loading control. (D) Proliferating HaCaT cells were incubated in DMEM or DMEM *Aloe* extract containing medium (1:10 v/v). Control and *Aloe*-treated cells were collected at 6, 24, 30, 48, and 54 h. Equal amount of cell lysates was subjected to immunoblot analysis with antibodies against ΔNp63α, cyclin D1, p21WAF, and Keratin 1, an early differentiation marker. Actin was used as a loading control. (E) Proliferating HaCaT cells were incubated in DMEM or DMEM *Aloe* extract containing medium (20% or 50% v/v). Control and *Aloe*-treated cells were collected at 24 h. Equal amount of cell lysates were subjected to immunoblot analysis with antibodies against cyclin D1, p21WAF, Keratin 1, an early differentiation marker, and PARP-1. Actin was used as a loading control.

according to what observed in tumor cells, Cyclin D1 tended to be down-regulated faster in *Aloe*-treated HaCaT cells while the p21WAF protein was up-regulated only in *Aloe*-treated cells. At 54 h of *Aloe* treatment, the remarkable decrease of Cyclin D1 along with sustained expression of p21WAF indicates that keratinocytes were anticipating cell-cycle withdrawal. p21WAF-depleted keratinocytes exhibit an increased proliferative potential and a drastic down-modulation of keratinocyte differentiation markers (Di Cunto *et al.*, 1998) pointing to an essential involvement of p21WAF in the control of keratinocyte terminal differentiation. In line with these observations, compared to control cells, *Aloe*-treated keratinocytes exhibited higher levels of p21WAF and CK1, in agreement with the induction of a

differentiation program. However, the persistence of ΔNp63α protein expression indicates that both treated and untreated keratinocytes were not fully differentiated (Fig. 3D).

Cyclin D1 protein is known to increase under mitogenic signals, through activation of the ERK's pathway. Remarkably, immunoblot analysis of lysates from proliferating HaCaT keratinocytes treated for 24 h with increasing amounts of *Aloe arborescens* extract (20% or 50% v/v) show that the reduction of Cyclin D1 and phosphorylated ERKs, as well as the induction of p21WAF and CK1, was dose dependent. Moreover, the signal corresponding to the cleavage of PARP1 was not enhanced, thus indicating that cells were not undergoing apoptosis (Fig. 3E).

We then decided to look at the effect of *Aloe* treatment on squamous carcinoma cell lines (SCC011 and SCC022). SCC is an uncontrolled growth of abnormal cells arising in the squamous layer, which composes most of the skin's upper layers. SCC cells retain high levels of $\Delta\text{Np63}\alpha$ that is absolutely required for the survival of early stages of the squamous carcinoma. We first determined the rate of cell proliferation in control and *Aloe*-treated SCC011 and SCC022 cells. As shown in Fig. 4A and B, in *Aloe* containing medium, both SCC011 and SCC022 cells stop growing. The cell-cycle profile of *Aloe*-treated SCC022 cells reveals a dramatic increase in percentage of sub-G1 cells at the expenses of G1 and G2/M cells (Fig. 4C). In SCC011, the increase of subG1 cells was less dramatic although the S phase arrest was evident (Fig. 4D). Growth arrest was associated with a characteristic enlarged and flattened cell morphology as shown by fluorescence microscopy in SCC011 cells (Fig. 4E). Interestingly, compared to SCC022, SCC011 cells display a stronger activation of the Akt survival marker (data not shown) suggesting that Akt may, indeed, counteract *Aloe*-induced cell death. Western blot analysis of control and *Aloe*-treated SCC011 shows a dramatic decrease of $\Delta\text{Np63}\alpha$ and a concomitant increase of p21WAF and

CK1 polymers (Fig. 4F). Importantly, since it has been shown that SCC011 and SCC022 proliferation is strictly dependent on $\Delta\text{Np63}\alpha$ (Rocco *et al.*, 2006), the dramatic reduction of $\Delta\text{Np63}\alpha$ induced by *Aloe* in these tumor cells may account for the cell death observed

Antibacterial tests

Inner leaf extract from *Aloe vera* was shown to inhibit growth of *Streptococcus* and *Shigella* species in vitro (Arunkumar and Muthuselvam, 2009). *Aloe*-emodin has been proposed to have direct antimicrobial activity. To assess whether the *Aloe* aqueous extract had antibacterial effects, two different plate antibacterial assays were performed with a panel of nine bacterial strains. As a first assay, LB or MRS plates were disseminated with each of the bacterial strain and spotted with the aliquots of *Aloe* extract. As a second assay, LB or MRS solid media containing various amounts of *Aloe* extract were spotted with aliquots of bacterial cells previously grown in liquid media. With both assays, no inhibition of bacterial growth was observed for any of the nine bacterial strains analysed (data not shown).

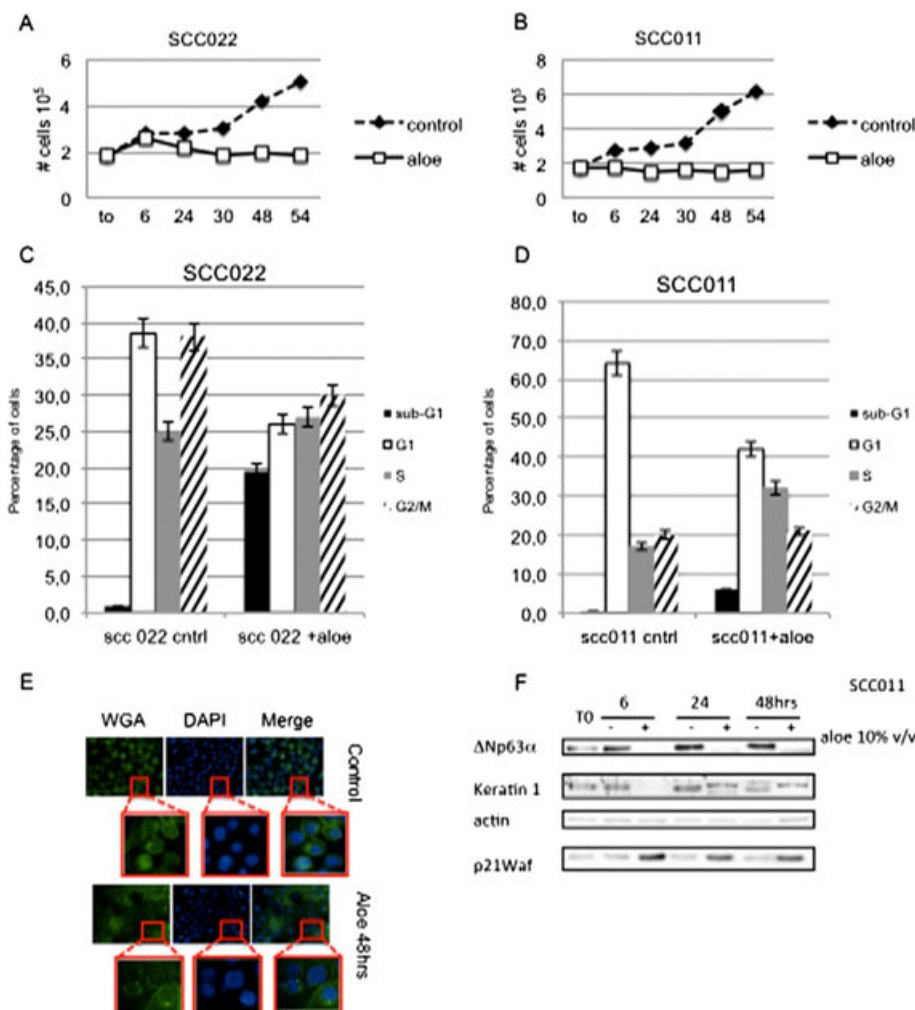


Figure 4. (A) Proliferating SCC022 and (B) SCC011 cells were incubated in complete cell culture medium supplemented or not with *Aloe* extract (1:10 v/v). Control and *Aloe*-treated cells were collected at 6, 24, 30, 48, and 54 h and counted in a Burkner chamber. (C) and (D) Representative data obtained from flow-cytometric analysis of cell cycle of SCC022 and SCC011 cells incubated with or without *Aloe* for 48 h. (E) Representative images of SCC011 cells fluorescently stained with WGA (labeling membrane glycoproteins) or DAPI. (F) Equal amount of cell lysates was subjected to immunoblot analysis with indicated antibodies. Actin was used as a loading control. This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com/journal/ptr.

Table 2. List of proteins differentially represented in *Aloe*-treated or control HaCaT cells identified by mass spectrometry.

| Aloe-treated | | | | | | |
|--------------|-------|-------|---|----------------|----------|-------------------|
| Spot | MW | Score | Protein | Swissprot code | Peptides | Sequence coverage |
| 1 | 72402 | 186 | 78 kDa glucose-regulated protein | P11021 | 8 | 20% |
| 2 | 50095 | 325 | Tubulin beta chain | P07437 | 11 | 34% |
| 3 | 11391 | 37 | Dermcidin | P81605 | 3 | 30% |
| 4 | 29843 | 60 | Prohibitin | P35232 | 6 | 25% |
| 5 | 22826 | 175 | Heat shock protein beta-1 | P04792 | 4 | 33% |
| 6 | 22436 | 53 | UMP-CMP kinase | P30085 | 4 | 42% |
| 7 | 23569 | 47 | Glutathione S-transferase P | P09211 | 6 | 42% |
| 8 | 17292 | 60 | Stathmin | P16949 | 2 | 18% |
| Control | | | | | | |
| Spot | MW | Score | Protein | Swissprot Code | Peptides | Sequence coverage |
| 9 | 62255 | 83 | Keratin, type I cytoskeletal 9 | P35527 | 5 | 10% |
| 10 | 71082 | 224 | Heat shock cognate 71 kDa protein | P11142 | 13 | 23% |
| 11 | 73920 | 49 | Stress-70 protein, mitochondrial | P38646 | 7 | 12% |
| 12 | 70294 | 68 | Heat shock 70 kDa protein 1A/1B | P08107 | 4 | 8% |
| 13 | 61187 | 492 | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | P10809 | 24 | 50% |
| 14 | 42052 | 156 | Actin, cytoplasmic 1 | P60709 | 9 | 34% |
| 15 | 32726 | 267 | Nucleophosmin | P06748 | 10 | 26% |
| 16 | 27871 | 189 | 14-3-3 protein sigma | P31947 | 9 | 37% |
| 17 | 16827 | 101 | Calmodulin | P62158 | 2 | 29% |

Proteomic analysis

Although *Aloe arborescens* extract has been largely used for its immunostimulating and anticancer properties, little is known of its impact at the proteome level. We thus decided to look at cell proteome changes of HaCaT keratinocytes induced by *Aloe* treatment. Protein extracts from untreated (Control) or *Aloe*-treated (Sample) HaCaT cells were fractionated by 2D-GE and stained with colloidal Blue Coomassie. The gels were run in triplicate and compared using the ImageMaster 2D Platinum 6.0 software. A few initial reference points (landmarks) were affixed for gels alignment in the first step of the images analysis. The spots were detected on the gels and the software 'matched' the gels and the corresponding spots. The spots representing the same protein in different gels were paired. Pairs were automatically determined using ImageMaster powerful gel matching algorithm. The different 2DE images were compared by synchronized 3-D spots view. Among the spots corresponding to *Aloe*-sensitive proteins clearly detected in repeated trials, 17 were selected for proteomic analysis. The image analysis enabled the identification of eight spots that were present either in higher amount or exclusively in the *Aloe*-treated sample, thereby indicating that they were induced by *Aloe* treatment. In the control sample, instead, nine spots that were undetectable or whose signal decreased after *Aloe* treatment were detected. These spots were selected for mass spectral identification by the merging of images analyses. Proteins excised from the gel were reduced, alkylated, and, in situ, digested with trypsin. The resulting peptide mixtures were analysed by nanoLC/MS/MS experiments. The peptide mixtures were fractionated by nanoHPLC and sequenced by MS/MS, generating sequence information on individual peptides. MSMS spectra were used to search for a non-redundant sequence using the in-house MASCOT software, thus taking advantage of the specificity of trypsin and of the taxonomic category of

the samples. The number of measured masses that matched within the given mass accuracy was recorded, and the proteins that had the highest number of peptide matches were examined leading to the identification of the protein components. As further selection criteria, only the proteins, identified by MASCOT search with at least two peptides and found exclusively in the replicates, were selected. The list of proteins identified by this approach is illustrated in Table 2.

Among the identified proteins, a signal corresponding to **Tubulin** showed an increment in the treated sample as well as that of a powerful antimicrobial peptide known as **Dermcidin** (DCD). This observation was particularly intriguing as we failed to detect a direct antimicrobial activity of *Aloe arborescens* against several bacterial strains (see above). DCD is constitutively expressed in eccrine sweat glands and is part of the constitutive innate defence of human skin and stimulates keratinocytes to produce cytokines and chemokines (Niyonsaba *et al.*, 2009). So far, no DCD expression was found, neither at RNA nor at protein level, in primary keratinocytes, fibroblasts, and melanocytes both in normal conditions, or in cells stimulated by LPS, TNF α , or TPA. Although the *Aloe* ability to stimulate DCD production by keratinocytes needs further investigations, our observation provides a novel insight for the *Aloe* implication in microbicidal ability and skin immunity. *Aloe* treatment also induced the expression of molecules involved in several aspects of keratinocyte proliferation and differentiation such as **GRP78**, **Prohibitin**, and **Stathmin**. Prohibitin is a potential tumor suppressor protein that exhibits growth suppressor ability by repressing E2F-mediated gene transcription (Joshi *et al.*, 2003). Stathmin is a microtubule-destabilizing protein and, in association with Tubulin and HSP70, was reported to be functionally relevant in the control of numerous regulatory pathways that require a reorganization of the entire cytoskeleton. GRP78 (also known as HSRPA5) was found to be increased in the suprabasal layers of

normal epidermis and can work as a molecular chaperone in cooperation with other Heat Shock Proteins being part of the unfolded protein response activated in differentiating epidermal keratinocytes (Sugiura *et al.*, 2009). In *Aloe*-treated HaCaT cells, heat shock proteins, essential for the survival of malignant cells, were under-represented. However, heat-shock proteins also occur under non-stressful conditions, simply 'monitoring' the cell's recycling or folding. Further experiments are needed to clarify this phenomenon.

Remarkably, Calmodulin and Keratin 1 signals were detected only in the control sample and disappeared following the *Aloe* treatment. The remaining proteins exhibited a sensitive decrement in the *Aloe*-treated sample.

CONCLUSIONS

The results presented in this study indicate a clear antiproliferative effect of an *Aloe* extract on several

tumor cells and a prodifferentiative effect both on primary and immortalized human keratinocytes.

For a medicinal application perspective, our study supports the use of *Aloe arborescens* extract for topical treatment of hyperproliferative skin diseases or skin SCC. *In vivo* animal experimentation will be necessary to further confirm the proposed health benefit of the extract.

Acknowledgements

This work was funded by MIUR (PRIN 2009KFS94X_003) to V. Calabrò. This work was also supported by Aloe-Beta-HDR sas Capriati a Volturmo - ITALY.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Arun Kumar S, Muthuselvam M. 2009. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against Clinical Pathogens. *World J Agric Sci* **5**(5): 572–576.
- Baccigalupi L, Di Donato A, Parlato M, *et al.* 2005. Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Res Microbiol* **156**: 830–8365.
- Bedini C, Caccia R, Triggiani D, Mazzucato A, Soressi GP, Tiezzi A. 2009. Micropropagation of *Aloe arborescens* Mill: A step towards efficient production of its valuable leaf extracts showing antiproliferative activity on murine myeloma cells. *Plant Biosystems-an Int J Deal Aspects Plant Biol* **143**(2): 233–240.
- Di Costanzo A, Festa L, Duverger O, *et al.* 2009. Homeodomain protein Dlx3 induces phosphorylation-dependent p63 degradation. *Cell Cycle* **8**(8): 1185–95.
- Di Cunto F, Topley G, Calautti E, *et al.* 1998. Inhibitory function of p21Cip/Waf1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* **280**: 1069–72.
- Dotto P. 1999. Signal Transduction Pathway controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med* **10**: 442–457.
- Fakhry S, Manzo N, D'Apuzzo E, *et al.* 2009. Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res Microbiol* **160**(10): 817–823.
- Greathead H. 2003. Plants and plants extracts for improving animal productivity. *Proc Nutr Soc* **62**: 279–290.
- Hochstrasser DF, Patchornik A, Merrill CR. 1988. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal Biochem* **173**(2): 412–23.
- Infascelli F, Tudisco R, Mastellone V, *et al.* 2010. Diet *Aloe* supplementation in pregnant buffalo cows improves colostrum immunoglobulin content. *Revista Veterinaria* **21**(Suppl. 1): 151–153.
- Joshi B, Ko D, Ordóñez-Ercan D, Chellappan SP. 2003. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **312**(2): 459–6.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lefort K, Mandinova A, Ostano P, *et al.* 2007. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCK α kinases. *Genes Dev* **21**: 562–577.
- Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, *et al.* 2009. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In Vivo* **23**(1): 171–5.
- Naclerio G, Ricca E, Sacco M, De Felice M. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *B. cereus*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 4313–4316.
- Niyonsaba F, Suzuki A, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. 2009. The human antimicrobial peptide dermicin activates normal human keratinocytes. *Br J Dermatol* **160**(2): 243–249.
- Paramio JM, Jorcano JL. 1997. Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human epidermal HaCaT cells. *Br J Dermatol* **137**(1): 44–50.
- Pecere T, Gazzola V, Mucignat C, *et al.* 2000. *Aloe*-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* **60**: 2800–2804.
- Rocco JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW. 2006. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **9**(1): 45–56.
- Sugiura K, Muro Y, Futamura K, *et al.* 2009. The unfolded protein response is activated in differentiating epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **129**(9): 2126–35.
- Vivo M, Di Costanzo A, Fortugno P, Pollice A, Calabrò V, La Mantia G. 2009. Downregulation of Δ Np63 α in keratinocytes by p14ARF-mediated SUMO-conjugation and degradation. *Cell Cycle* **31**: 8(21): 3537–3543.
- Wessel D, Flugge UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**(1): 141–143.
- Youngman P, Perkins JB, Sandman K. 1984. New genetic methods, molecular cloning strategies and gene fusion techniques for *Bacillus subtilis*/ which take advantage of Tn/ 917/ insertional mutagenesis. In Hoch JA, Ganesan AT (eds.). Genetics and Biotechnology of Bacilli. Academic Press: NY; 103–111.